



**Katherine Alejandra  
da Silva Rodrigues**

**Técnicas Moleculares na Detecção de Vírus  
Respiratórios**



**Katherine Alejandra  
da Silva Rodrigues**

**Técnicas Moleculares na Detecção de Vírus  
Respiratórios**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica da Dra. Ana Paula Castro, Médica Assistente Hospitalar Graduada, do Serviço de Microbiologia Hospital de Santo António, Porto e co-orientação da Professora Doutora Adelaide Almeida, Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

## **o júri**

presidente

**Doutora Gabriela Moura**

Investigadora Auxiliar do Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (CESAM), Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro

**Doutora Ana Paula Castro (orientador)**

Médica Assistente Hospitalar Graduada do CHP – Hospital de Santo António, Porto

**Prof. Dra. Adelaide Almeida (co-orientador)**

Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

**Doutora Maria Helena Ramos (arguente)**

Chefe de Serviço com funções de Direcção do Serviço de Microbiologia do CHP - Hospital de Santo António, Porto.

## **agradecimentos**

Agradeço à Doutora Maria Helena Ramos Directora do Serviço de Microbiologia e da Unidade de Biologia Molecular do Hospital de Santo António pela oportunidade dada para a realização deste trabalho.

Agradeço à minha orientadora, Doutora Ana Paula Castro médica do Serviço de Microbiologia pela oportunidade para a realização deste trabalho, pela orientação científica e por todo o conhecimento e paciência concedida.

Agradeço à minha co-orientadora, Professora Doutora Adelaide Almeida a orientação científica deste estudo e por todo o apoio fornecido.

Agradeço à Doutora Ana Cláudia Santos, médica do Serviço de Microbiologia pelo apoio e incentivo dados para a realização deste trabalho.

Agradeço à Doutora Isabel Fonseca por toda a ajuda amavelmente concedida.

Agradeço à Mestre Ana Constança Mendes, por ser uma pessoa admirável que disponibiliza constantemente todo o seu saber em prol dos outros. Obrigada pelo incentivo, pelo conhecimento científico e sobretudo pelo carinho, força e amizade.

Agradeço à Mestre Sandra João Fernandes, pela disponibilidade, pelo conhecimento científico, pelo carinho e amizade. Obrigada por me aturares...

Agradeço aos meus colega da Unidade de Biologia Molecular e Microbiologia, muito especialmente aos meus colegas e amigos Filomena, Júlio e Tânia, por tão prontamente me ajudarem sempre que necessário, por toda a paciência, carinho e amizade, Obrigada.

Agradeço à minha colega e amiga Madalena Cruz, por toda a ajuda, por toda a força, e amizade, obrigada por toda a tua boa energia contagiante.

Aos meus Pais, Amândio e Maria do Céu e à pessoa que mais admiro e de quem mais me orgulho, a minha pequena grande irmã, Marlene, pela força, pelo sempre incentivo, por todo o carinho e apoio. Obrigada.

Agradeço à Universidade de Aveiro, em particular ao Departamento de Biologia que me proporcionaram todas as condições para desenvolver o meu trabalho.

## palavras-chave

Crianças, Vírus respiratórios, diagnóstico laboratorial, Imunofluorescência; técnicas moleculares

## resumo

São vários os vírus capazes de causar infecção respiratória, provocando quadros clínicos mais ou menos graves, ainda considerados causa de morbilidade e mortalidade em todo o mundo. A aplicação de técnicas de biologia molecular ao estudo das infecções respiratórias permitiu, nos últimos anos, identificar novos vírus associados a patologias respiratórias (metapneumovirus humano, bocavirus e coronavírus, entre outros). A detecção através de técnicas mais sensíveis como as técnicas moleculares facilita o diagnóstico precoce tendo como consequência um controlo mais eficaz da infecção, sendo possível providenciar atempadamente medidas de isolamento necessárias, evitando assim possíveis surtos hospitalares.

O objectivo deste trabalho foi implementar a detecção molecular de vírus respiratórios no laboratório de Biologia molecular, Serviço de Microbiologia do CHP - Hospital de Santo António, Porto.

Para tal, foram usados três kits moleculares disponíveis no mercado e o melhor kit (em termos de custo, rapidez e facilidade de execução técnica) foi implementado na rotina do Laboratório. No estudo inicial para a escolha da metodologia a implementar, foram estudadas 58 amostras (lavado nasofaríngeo) no período compreendido entre Julho de 2009 e Junho de 2010, provenientes maioritariamente de crianças com idade inferior a cinco anos, com quadro de doença respiratória. Os resultados obtidos foram comparados com os resultados de IFI (Biotrin®) efectuado na rotina laboratorial do serviço de Microbiologia.

O estudo molecular compreendeu a extracção de ácidos nucleicos, amplificação e detecção de vírus respiratórios por três kits distintos: RV15 ACE Detection, Seegene; Pneumovir - CLART®; Magicplex™ RV Panel Real-Time Test.

Após implementação na rotina laboratorial do kit Magicplex™ RV Panel Real-Time Test, foram estudadas 263 amostras, entre Fevereiro e Agosto de 2011 provenientes maioritariamente do Internamento e Urgência de Pediatria.

No estudo comparativo, o número de vírus detectados pelas três técnicas foi diferente (RV15 -68; Pneumovir-76; Magicplex – 87), os vírus mais comumente detectado foi o RhV (RV15-n=23, 34 %; Pneumovir - n=21, 28 %; Magicplex - n=29, 33 %) seguido de VSR (RV15-n=19, 28 %; Pneumovir - n=19, 25 %; Magicplex - n=23, 26 %). Nas três técnicas foram identificadas co-deteções (RV15 -17; Pneumovir-19; Magicplex – 21) sendo a detecção dupla mais frequente a associação AdV/RhV (Pneumovir n=5, 38 %; Magicplex n=4, 33 %) e VSR/RhV (RV15 n= 6, 43 %).

Após implementação do kit Magicplex™ RV Panel Real-Time Test na rotina, das 263 amostras estudadas, 210 foram positivas e 53 amostras negativas para a detecção de vírus respiratórios.

O vírus mais comumente detectado foi o AdV (n=120, 57 %) seguido RhV (n=74, 35 %). Das 90 detecções duplas a mais frequente foi AdV/VSR (n=20, 22 %).

O estudo comparativo permitiu avaliar a superior sensibilidade dos métodos moleculares, tendo a escolha recaído sobre o kit Magicplex™ RV Panel Real-Time Test por ser o que apresenta uma melhor relação entre custo/benefício, bem como por ser o método de mais fácil implementação.

Os resultados obtidos após seis meses da implementação na rotina laboratorial, revelaram um número elevado de co-deteções. Há ainda uma grande dificuldade na interpretação clínica destes resultados. A quantificação da carga viral, deverá ser o passo seguinte deste trabalho.

## Keywords

Children, Respiratory viruses, laboratory diagnosis, immunofluorescence, molecular techniques

## Abstract

Several viruses are responsible for respiratory infections, with possible severe clinical conditions, considered a cause of morbidity and mortality worldwide. The application of molecular biology techniques to the study of respiratory infections allowed the identification of new viruses associated with respiratory disease (human metapneumovirus, bocavirus and coronavirus, among others). The use of sensitive molecular techniques, allows early diagnosis resulting in more effective infection control, providing timely patient isolation, thus avoid.

To evaluate three molecular methods for detection of respiratory viruses. After comparison of different kits, to implement a molecular method suitable for routine laboratory analysis, evaluating cost, speed and ease of technical implementation.

For comparison purposes, we studied 58 samples (nasopharyngeal lavage) collected between July 2009 and June 2010, mostly from children under the age of five years, with respiratory disease. Results were compared with IF results (Biotrin®, Diagnostics Híbridos®) performed in the routine microbiology laboratory. The molecular analysis included nucleic acid extraction, amplification and detection of respiratory viruses by three different kits: RV15 ACE Detection, Seegene; Pneumovir - CLART®; Magicplex™ RV Panel Real-Time Test. After implementation of Magicplex™ RV Panel Real-Time Test in laboratory routine, 263 samples were studied between February and August 2011, mostly from Pediatric ward and emergency. Results: In the comparative study, the number of viruses detected by the three techniques was different (RV15- 68; Pneumovir-76; Magicplex - 87), the most commonly detected virus was RhV (RV15-n = 23, 34 %; Pneumovir - n = 21, 28 %; Magicplex - n = 29, 33%) followed by VSR (RV15 n = 19, 28%; Pneumovir - n = 19, 25 %; Magicplex - n = 23, 26 %). The three techniques allowed identification of co-detections (RV15- 17; Pneumovir-19; Magicplex - 21) the most common being the association AdV / RhV (Pneumovir n = 5, 38 %; Magicplex n = 4, 33 %) and VSR/RhV (RV15n=6,43%). After implementation of the kit Magicplex™ RV Panel Real-Time Test, of the 263 samples studied, 210 were positive and 53 negative for the detection of respiratory viruses. The more commonly detected virus was AdV (n = 120, 57 %) followed by RhV (n = 74, 35%). In 90 double detections, the most frequent association was AdV/RSV (n=20,22%). The comparative study demonstrated the superior sensitivity of molecular methods, which lead us to choose the kit Magicplex™ RV Panel Real-Time Test, since it showed a better cost / benefit ratio, as well as better suitability for laboratory implementation.

The results after six months of implementation in the routine laboratory, revealed a high number of co-detections, as well as the difficulty in clinical interpretation of these results. Thus, the implementation of complementary methodologies, as well as quantitation of the viral load, may be the next steps in completing this work.

## Abreviaturas

---

AdV: Adenovirus  
ARD: Acute Respiratory Disease  
BoV: Bocavirus  
CDC: Center for Disease Control and Prevention  
CoV: Coronavirus  
DGS: Direcção Geral de Saúde  
DNA: Acido Desoxirribonucleico  
EV: Enterovirus  
HA: Hemaglutinina  
IFD: Imunofluorescência Directa  
IFI: Imunofluorescência Indirecta  
INF: Influenza  
IRA: Infecção Respiratória Aguda  
IREV: Infecções Respiratórias de Etiologia Viral  
IVRI: Infecção das vias respiratórias Inferiores  
MPV: Metapneumovirus  
NA: Neuraminidase  
NP: Nucleocapside  
OMS: Organização Mundial de Saúde  
PCR: Reacção da Polimerase em Cadeia  
PIV: Vírus Parainfluenza  
RhV: Rhinovirus  
RNA: Ácido ribonucleico  
RT-PCR: Transcrição reversa  
SARS: Severe Acute Respiratory Syndrome  
VSR: Vírus Sincicial Respiratório

<b>1. Introdução.....</b>	<b>2</b>
1.1 Agentes Etiológicos .....	5
1.1.1 Vírus Influenza.....	6
1.1.2 Vírus Parainfluenza.....	10
1.1.3 Metapneumovírus.....	12
1.1.4 Vírus Sincicial Respiratório .....	15
1.1.5 Coronavirus .....	18
1.1.6 Bocavirus .....	20
1.1.7 Adenovirus .....	22
1.1.8 Rhinovirus.....	25
1.1.9 Enterovirus .....	28
1.2. Transmissão dos Vírus Respiratórios.....	30
1.3. Patogénese das Doenças Respiratórias Víricas .....	32
1.3.1. Infecção do Trato Respiratório Superior .....	32
1.3.2. Infecção do Trato Respiratório Inferior.....	32
1.3.2.1. Bronquiolite.....	33
1.3.2.2. Pneumonia .....	33
1.3.3. Asma.....	34
1.4. Prevenção da Infecção por Vírus Respiratórios .....	35
1.4.1. Medidas Básicas de Higienização .....	35
1.4.2. Vacinas .....	35
1.5. Tratamento de Infecções Virais Respiratórias .....	37
1.5.1. Fármacos utilizados para infecções respiratórias por vírus influenza .....	37
1.5.1.1. Amantadina e Rimantadina.....	37
1.5.1.2. Oseltamivir e Zanamivir .....	38
1.5.2. Fármacos utilizados para infecções respiratórias por vírus parainfluenza .....	38
1.5.3. Fármacos utilizados para infecções respiratórias por VSR.....	38
1.6. Diagnóstico das Infecções por Vírus Respiratórios .....	39
1.6.1 Culturas Celulares.....	39
1.6.2. Testes Imunocromatográficos.....	39



1.6.3. Serologia.....	40
1.6.4. Imunofluorescência.....	40
1.6.5. Métodos Moleculares .....	41
<b>2-Objectivos.....</b>	<b>43</b>
<b>3 - Material e Métodos .....</b>	<b>45</b>
3.1. Estudo inicial para selecção da técnica molecular a implementar .....	46
3.1. 1. Amostras.....	46
3.1.2. Métodos de detecção.....	46
3.1.2.1. Detecção de antigénios virais.....	46
3.1.2.1.1. Imunofluorescência Indirecta .....	46
3.1.2.1.2. Imunofluorescência Directa .....	47
3.1.2.2. Detecção por Métodos Moleculares.....	47
3.1.2.2.1. Extracção do Ácido Nucleico .....	47
3.1.2.2.2. Detecção do Ácido Nucleico.....	47
Detecção com o Kit RV15 ACE Detection, Seegene .....	47
Detecção com o Kit: CLART® (Clinical Array Technology) Hibridação com microarrays de baixa densidade.....	51
Detecção pelo kit Magicplex™ RV Panel Real-Time Test .....	53
3.2. Estudo com a técnica seleccionada.....	57
3.2.1. Amostras .....	57
3.2.2. Extracção, amplificação e detecção viral .....	57
3.2.3. Análise Estatística.....	57
<b>4 -Resultados .....</b>	<b>58</b>
4.1. Resultados do estudo comparativo.....	59
4.1.1. Caracterização da amostra do estudo comparativo .....	59
4.1.2 Resultados da técnica de IFI.....	61
4.1.3. Resultados dos métodos moleculares .....	61
4.1.3.1 Kit RV15 .....	61
4.1.3.2. Kit Pneumovir.....	62
4.1.3.3. Kit Magicplex .....	64
4.1.4. Comparação dos resultados obtidos pelos três kits.....	65
4.1.5 Variação dos vírus detectados ao longo do período do estudo.....	68
4.1.6 Relação entre diagnóstico clínico e vírus detectados .....	69

4.2. Resultados da técnica Implementada .....	69
4.2.1. Distribuição por faixa etária .....	70
4.2.2. Diagnósticos correspondentes às amostras estudadas .....	70
4.2.3. Relação entre os diagnósticos e idade .....	71
4.2.4. Frequências dos vírus pesquisados .....	72
4.2.5. Tipos de associações .....	73
4.2.6. Relação entre diagnóstico e vírus detectados .....	73
<b>5 -Discussão .....</b>	<b>76</b>
5.1. Resultados referentes às metodologias moleculares estudadas.....	77
5.2. Discussão dos resultados obtidos na Implementação da técnica.....	79
<b>6 – Considerações finais.....</b>	<b>82</b>
<b>7 - Bibliografia .....</b>	<b>84</b>

## Índice de Tabelas

---

Tabela 1 - Programa de Transcrição Reversa - RV15.....	48
Tabela 2 - Vírus detectados nas diferentes misturas de reacção – RV15 .....	49
Tabela 3 - Programa de Amplificação RV15 ACE.....	50
Tabela 4 - Programa de amplificação CLART® (Clinical Array Technology).....	52
Tabela 5 - Programa de Transcrição Reversa – Magicplex.....	54
Tabela 6 - Programa de Amplificação – Magicplex .....	54
Tabela 7 - Agentes detectados - Magicplex .....	55
Tabela 8 - Programa de Detecção - Magicplex.....	55
Tabela 9 - Interpretação da detecção e respectivas fluorescências - Magicplex.....	56
Tabela 10 - Distribuição percentual da população por sexo.....	59
Tabela 11 - Totalidade de diagnósticos clínicos .....	60
Tabela 12 - Resultados concordantes para os três kits comerciais estudados .....	67
Tabela 13 - Valores de sensibilidade, especificidade, VPP e VPN das técnicas estudadas .....	68
Tabela 14 - Distribuição da população segundo o diagnóstico clínico.....	71
Tabela 15 - Distribuição dos vírus detectados .....	72
Tabela 16 - Vírus detectados e tipos de associação.....	73
Tabela 17 - Associação entre o diagnóstico clínico e vírus detectado .....	74
Tabela 18 - Hipóteses nulas consideradas .....	74
Tabela 19 - Resultados do teste de Qui-quadrado para a análise das hipóteses nulas.....	75

## Índice de Figuras

---

Figura 1 - Distribuição da população estudada por faixas etárias (meses).....	59
Figura 2 - Totalidade de vírus detectados pelo Kit RV15 .....	61
Figura 3 - Vírus detectados pelo kit RV15 isoladamente e em associação .....	62
Figura 4 - Vírus respiratórios detectados pelo kit Pneumovir.....	63
Figura 5 – Vírus respiratórios detectados isoladamente e em associação pelo kit Pneumovir.....	63
Figura 6 - Vírus respiratórios detectados pelo kit Magicplex.....	64
Figura 7 - Vírus respiratórios detectados isoladamente e em associação pelo kit Magicplex.....	65
Figura 8 - Detecções simples identificadas pelos três kits .....	65
Figura 9 - Co-detecções identificadas pelos três kits .....	66
Figura 10 - Vírus detectados nos diferentes meses do ano .....	68
Figura 11 - Vírus presentes nas amostras dos diferentes quadros clínicos .....	69
Figura 12 - Distribuição das idades (anos) .....	70
Figura 13- Distribuição das idades (anos) e diagnósticos .....	71

# **1 - Introdução**

## 1. Introdução

---

As infecções respiratórias são a maior causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo consideradas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como a segunda causa de morte em crianças com idade inferior a 5 anos causadas por um grupo heterogêneo de vírus e bactérias (Esper et al. 2003). Apresentam normalmente sinais e sintomas semelhantes, indistinguíveis por diagnóstico clínico, estando portanto a sua identificação quase inteiramente dependentes do diagnóstico laboratorial (Li et al. 2007) (Lam et al. 2007).

Só no último século estima-se que cerca de 100 milhões de pessoas tenham sido vítimas mortais de infecções respiratórias por vírus influenza, sendo a maior parte crianças e idosos (Beck and Henrickson 2010).

As infecções respiratórias de etiologia viral (IREV) estão associadas ao aumento de morbidade e mortalidade em idosos, indivíduos imunocomprometidos, crianças prematuras e recém-nascidos, apresentando taxas de infecção superiores em crianças (Arden and Mackay 2010). Embora muitas vezes auto-limitadas em adultos saudáveis, podem, contudo, ser mais severas em determinados grupos de risco com predisposição para infecções oportunistas. Neste grupo poderão, para além dos já enumerados estar englobadas, entre outras, as doenças crónicas, doenças metabólicas e disfunção renal (Gillim-Ross and Subbarao 2006) (Kunz and Ottolini 2010).

Dos agentes víricos etiológicos mais comumente associados a infecções do trato respiratório salientam-se os vírus Influenza A e B, vírus Parainfluenza (PIV1,PIV2,PIV3 e PIV4), Metapneumovirus (MPV), Vírus Sincicial Respiratório (VSR), Adenovirus (AdV), Rhinovirus (RhV) e Enterovirus (EV).

A emergência de novos vírus e subtipos de vírus respiratórios desde 2000, incluindo Metapneumovirus, Coronavirus SARS-CoV, Coronavirus CoV-NL63 e HKU1; vírus influenza

e subtipos H5N1, H1N1 e Bocavirus (BoV) apresentaram-se como novos desafios para os laboratórios de virologia (Renois et al. 2010).

A maior parte das viroses podem ser transmitidas através de gotículas de saliva infectadas eliminadas pelo espirro, tosse ou mesmo durante a fala, podendo também ocorrer transmissão pessoa a pessoa por contacto das mãos com secreções contaminadas. A maior parte dos vírus pode permanecer viável em superfícies inertes durante várias horas (Paranhos-Baccala et al. 2008)

Tradicionalmente as técnicas de diagnóstico laboratorial utilizadas na detecção de vírus respiratórios, são a cultura celular, testes de imunofluorescência (directa e indirecta), testes imunocromatográficos, testes serológicos e mais recentemente técnicas moleculares.

O isolamento em culturas celulares é considerada a técnica padrão em laboratórios de investigação. Esta técnica é muito específica, sendo, porém, demorada. Algumas estirpes virais não crescem em linhas celulares e outras, tais como o MPV, crescem mal e/ou lentamente em culturas celulares. Consequentemente, os resultados não estão disponíveis em tempo clinicamente útil (Letant et al. 2007) (Lee J. H. et al. 2010).

Alguns estudos demonstraram que a técnica de imunofluorescência (frequentemente utilizada) é menos sensível e específica, tendo sido demonstrado que detecta apenas 19% dos vírus respiratórios com carga viral abaixo de  $10^6$  cópias/mL. Foi também demonstrada a existência de falsos-negativos (30 %) na detecção dos vírus influenza por Imunofluorescência (Lam et al. 2007) (Letant et al. 2007).

Nos últimos anos, o desenvolvimento de técnicas de amplificação de ácidos nucleicos, aplicadas ao diagnóstico das infecções virais do trato respiratório, vieram incrementar uma série de vantagens no diagnóstico e tratamento das mesmas, assim como um melhor conhecimento da etiologia da doença.

A partir dos resultados obtidos com estas metodologias, nos últimos anos, foi possível obter uma imagem mais detalhada da variação sazonal, assim como determinar o potencial patogénico de vírus até então associados a sintomas mais leves, como o

Rhinovirus. A capacidade de detectar simultaneamente múltiplos agentes virais com elevada sensibilidade, é uma mais-valia na detecção laboratorial por estas metodologias. Alguns estudos mostraram que as co-infecções podem potenciar a patogenicidade de alguns vírus (Olofsson et al. 2011).

A quantificação viral realizada por técnicas de PCR em tempo real para além da alta sensibilidade e especificidade poderá ser uma ferramenta valiosa na avaliação das co-infecções, permitindo avaliar se estas contribuem efectivamente para aumentar a gravidade do quadro clínico.

Um diagnóstico rápido e preciso da etiologia viral da doença é essencial para a escolha da terapia adequada, prevenindo assim a propagação de doenças nosocomiais e possíveis infecções secundárias oportunistas (Coiras et al. 2004). Por outro lado, a implementação de técnicas de PCR em tempo real pode ser usada para fazer a monitorização de alteração de níveis de carga viral durante o tratamento (Kuypers et al. 2009)

A detecção através de técnicas mais sensíveis facilita o diagnóstico precoce tendo como consequência um controlo mais eficaz da infecção, sendo possível providenciar atempadamente medidas de isolamento necessárias, evitando assim possíveis surtos hospitalares (Kuypers et al. 2009).



## 1.1 Agentes Etiológicos

---

Os patógenos virais responsáveis pela maioria das infecções do trato respiratório incluem os vírus Influenza (INF), Parainfluenza (PIV), Adenovirus (AdV) e Vírus Sincicial Respiratório (VSR). Desde 2001 foram identificados cinco novos vírus responsáveis por infecções respiratórias, Metapneumovirus (MPV), identificado em 2001, Coronavírus associado ao síndrome respiratório agudo grave (SARS-CoV) identificado em 2003; Coronavírus NL63 identificado em 2004; Coronavírus HKU1 e o Bocavírus (BoV) identificados em 2005 (Sloots et al. 2008). Estes vírus são majoritariamente vírus de RNA, com exceção do AdV e BoV que são vírus de DNA de cadeia dupla.

As razões de emergência ou re-emergência de patógenos são variadas e, variam desde alterações ambientais até à ocorrência de mutações no genoma do agente. Uma vez identificados, é necessário estabelecer o seu potencial patogénico. O esclarecimento das propriedades biológicas dos novos vírus, identificação do ciclo de replicação, cinética de replicação e vias de entrada no hospedeiro são dados fundamentais na determinação do potencial patogénico de cada vírus, favorecendo a criação de estratégias de tratamento e prevenção (Gillim-Ross and Subbarao 2006).

A interacção dos vírus com os hospedeiros tem sido amplamente investigada, produzindo informação sobre a especificidade das ligações dos diferentes vírus às células.

### 1.1.1 Vírus Influenza

Os vírus Influenza (INF) são responsáveis por pandemias graves ocorridas na história da humanidade. O agente etiológico da gripe, foi inicialmente isolado em 1933 (Influenza A), em 1940 (Influenza B) e em 1951 (Influenza C). Nos Estados Unidos da América os vírus Influenza A e B causam epidemias resultando em 20.000 a 30.000 mortes/ano, 100.000 hospitalizações/ano e um custo anual de 3 a 5 bilhões de dólares (Kesson 2007)(Pachucki 2005). Fazem parte da família *Orthomyxoviridae* e gênero *Influenzavirus*, (Lupatkin 2005). São vírus de RNA de cadeia simples e de sentido negativo, são pleomórficos, diâmetro com cerca de 80-120 nm, envolvidos por um invólucro lipídico com projecções superficiais (Gillim-Ross and Subbarao 2006). O genoma é constituído por 7-8 segmentos envolvidos por um capsídeo proteico de simetria helicoidal e por um invólucro lipoproteico onde se inserem as glicoproteínas - hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA) (Pajak et al. 2011). Baseado nas diferenças antigénicas da nucleocápside (NP) e nas proteínas de matriz (M) os vírus Influenza foram divididos em três tipos distintos: A, B e C. Os tipos A e B causam doenças respiratórias mais graves, enquanto o C causa doença mais leve em crianças e jovens adultos, não estando associado a surtos, epidemias ou pandemias (Huang et al. 2009).

Os vírus Influenza tipo A apresentam maior variabilidade, são divididos em diferentes subtipos e caracterizam-se segundo as glicoproteínas de superfície: Hemaglutinina (HA – cuja principal função é ligar o vírus ao receptor da célula hospedeira) e Neuraminidase (NA – enzima capaz de destruir os receptores celulares e libertar os vírus da célula infectada após a replicação viral) (Kesson 2007) (Huang et al. 2009). As proteínas de superfície HA e NA são os principais antígenos protectores conferindo-lhe potencial infeccioso e resistência (Gillim-Ross and Subbarao 2006). A HA medeia a ligação do vírus Influenza às células pela interacção com o ácido siálico contendo receptores na sua superfície das células alvo, enquanto a NA cliva os resíduos celulares de ácido siálico, aos quais estão ligadas as novas partículas víricas formadas no interior da célula (viriões) (Gillim-Ross and Subbarao 2006)(Lupatkin 2005). Embora tenham sido identificados 16

hemaglutininas diferentes (H1 a H16) e 9 subtipos diferentes de neuraminidases (N1 a N9), apenas três combinações têm circulado amplamente na população humana (H1N1, H2N2, H3N2) (Huang et al. 2009). Estas combinações resultam de variações antigénicas que podem ser moderadas – deslizamento antigénico - “*antigenic drift*”, que se caracteriza por variações graduais envolvendo pequenas mudanças na HA e NA, que ocorrem anualmente e são responsáveis por epidemias sazonais de menor gravidade ou variações mais significativas designadas salto antigénico - “*antigenic shift*”, que resultam na substituição de um segmento do genoma por outro de outra partícula viral (Knipe et al. 2006). Estas variações são de maior dimensão, restritas ao vírus A e podem estar associadas a pandemias. Como consequência destas últimas variações antigénicas pode surgir um novo vírus Influenza, formado por uma nova HA ou HA e NA, sendo imunologicamente distinto dos vírus circulantes em anos anteriores. As mutações pontuais nos genes que codificam as glicoproteínas de superfície permitem aos vírus influenza escapar à neutralização pelos anticorpos produzidos por imunidade activa ou passiva, o que explica as epidemias anuais de influenza (Knipe et al. 2006).

A replicação viral ocorre no núcleo da célula hospedeira. O vírus liga-se à superfície da célula hospedeira através da hemaglutinina, entra na célula e inicia a replicação usando o material celular. Os viriões recém-formados saem da célula e são libertados pela neuraminidase viral, permitindo que o ciclo infeccioso continue (Knipe et al. 2006).

As epidemias sazonais anuais ocorrem em todo o mundo, constituindo uma das maiores causas de morte, sendo responsáveis por gastos consideráveis (Tamura et al. 2009). Os vírus Influenza A são patogénicos em humanos e animais, enquanto o vírus B apenas causa doença em humanos e o vírus C causa doenças em humanos e animais mas de gravidade moderada a ligeira. Foi descrito que os porcos têm receptores celulares para as estirpes humanas e aviárias de vírus influenza A no trato respiratório superior e, portanto, são susceptíveis a infecções por ambos os tipos de partículas virais. Deste modo foi proposto que os porcos poderiam actuar como reservatórios quando infectados por estas estirpes, originando um novo vírus com potencial zoonótico e, consequentemente, eventual causador de pandemia. Nos últimos anos, no entanto, tem havido exemplos de

Influenza A a cruzar a barreira das espécies, sem o envolvimento de suínos (Trebbien et al. 2011).

O vírus Influenza A foi anteriormente responsável por várias epidemias e por três das maiores pandemias do século XX, tendo estado na origem da primeira pandemia do século XXI:

**H1N1** – Apareceu em 1918 sendo designada por gripe espanhola. Foi responsável por cerca de 50 milhões de mortes em todo o mundo (Korteweg and Gu 2010).

Em Abril de 2009 surgiu no México uma nova variante deste vírus dando origem a uma nova pandemia (a primeira do século XXI) que atingiu principalmente indivíduos com menos de 65 anos e sobretudo adultos saudáveis (Pabbaraju et al. 2009) (Pajak et al. 2011).

**H2N2** – Apareceu em 1957 e foi designada de gripe asiática. Resultou numa pandemia com 70.000 mortes estimadas (Knipe et al. 2006).

**H3N2**- Apareceu em 1968 e foi referida como gripe de Hong Kong (Knipe et al. 2006).

**H5N1** – Apareceu em 1997 e foi designada de gripe das aves. Em 2007 a gripe aviária pelo H5N1 ficou limitada a surtos aviários em alguns países do sudoeste asiático (Gillim-Ross and Subbarao 2006). Recentemente, em 2003, foram infectadas mais de 440 pessoas, sendo confirmada a presença do vírus em 10 países originando uma taxa de mortalidade superior a 50 %, tendo sido considerada uma pandemia (Mahony 2008) (Korteweg and Gu 2010).

Nas regiões do hemisfério norte as epidemias geralmente ocorrem entre Dezembro e Março, enquanto no hemisfério sul o período epidémico é de Maio a Agosto. Em climas temperados os vírus influenza podem ser isolados durante todo o ano (Murray et al. 2007).

O vírus é transmitido de pessoa a pessoa, através de gotículas disseminadas por pessoas infectadas. O período de incubação varia de 1 a 4 dias, variando o período de transmissão entre 1 a 2 dias antes do aparecimento dos sintomas e até 5 dias depois da doença instalada (Lupatkin 2005).

Os sintomas caracterizam-se por febre repentinamente elevada, acompanhada de sintomas respiratórios tais como tosse, congestão nasal e sintomas sistémicos tais como cefaleias, arrepios, mialgia e mal-estar (Mahony 2008).

A principal medida preventiva contra a gripe é a vacinação. Existem duas classes de antivirais aprovadas para a profilaxia e tratamento de vírus Influenza, os que actuam nos bloqueadores de proteína M2 (amantadina e rimantadina) e os inibidores da neuraminidase (oseltamivir e zanamivir) (Laplante et al. 2009) (Monto and Whitley 2008).

O diagnóstico laboratorial pode ser realizado por cultura celular, imunoensaio com detecção de antígenos virais, serologia e métodos moleculares (Forbes et al. 2008). Como metodologia de resposta rápida para o surto pandémico H1N1v2009, o Center for Disease Control and Prevention (CDC) providenciou uma metodologia detalhada de PCR em tempo real (Pabbaraju et al. 2009).

### 1.1.2 Vírus Parainfluenza

Isolados inicialmente em 1956, os Parainfluenza vírus (PIV) são causa comum de doença do trato respiratório, sendo o principal agente de laringotraqueobronquite em lactentes e crianças. É considerado o segundo vírus mais comum causador de infecções respiratórias inferiores em crianças menores de 6 anos, podendo manifestar-se como causa de pneumonia e bronquiolite (Kim et al. 2007). O PIV pode ainda provocar doença significativa em idosos e imunocomprometidos (Espy et al. 2006).

Os PIV fazem parte da família *Paramyxoviridae*, género *Paramyxovírus* (Mahony 2008). São vírus com invólucro, com 150-250 nm de diâmetro, vírus de RNA, cadeia simples, não segmentado, que codifica 6 proteínas estruturais. Existem quatro serotipos distintos capazes de infectar os humanos: PIV-1, PIV-2, PIV-3, e PIV-4. Os tipos 1, 2, e 3 podem surgir em todo o mundo e em todas as faixas etárias, sendo o PIV-3 o mais comum. O grupo 4 subdivide-se em 4A e 4B, sendo estes geralmente menos detectados (Kesson 2007).

O PIV1 é a principal causa de faringite em crianças, enquanto o PIV2 é menos frequente. O PIV3 está frequentemente associado a bronquiolites e pneumonia, o PIV4 embora menos frequentemente detectado, com relativa frequência é causa de doença grave, tendo no entanto, já sido descrito um surto por PIV4 em Hong Kong (Lau et al. 2009).

A replicação dos membros da família *Paramyxoviridae* ocorre no citoplasma. A absorção viral nas células hospedeiras resulta na combinação da glicoproteína H do invólucro do virião com os receptores da membrana celular. A fusão celular e a infectividade viral são acentuadas pela clivagem proteolítica da proteína F e pela inibição desta actividade por inibidores enzimáticos. O vírus funde-se com a membrana citoplasmática, resultando na libertação do nucleocapsídeo no citoplasma onde o RNA é transcrito em RNA mensageiro e posteriormente traduzido (Knipe et al. 2006).

O pico de PIV3 incide normalmente na Primavera, enquanto o pico do PIV 1 e 2 é no Outono e no início do Inverno. O PIV1 está associado a epidemias durante o Outono em

anos alternativos, o PIV2 ocorre esporadicamente, sendo que os padrões de sazonalidade do PIV4 não são ainda bem conhecidos (Kesson 2007) (Kim Y. J. et al. 2007).

A transmissão ocorre normalmente por contacto directo através da inalação de gotículas respiratórias infectadas ou através de objectos contaminados. O período de incubação varia de 1 a 4 dias sendo a duração de excreção viral em indivíduos saudáveis de cerca de uma semana, podendo prolongar-se por quatro semanas em doentes imunocomprometidos (Kim Y. J. et al. 2007).

Os sintomas podem variar de moderados (quando afecta o trato respiratório superior), traduzindo-se em rinites e faringites, a manifestações mais severas quando afecta o trato respiratório inferior podendo causar bronquiolite e pneumonia (Bartlett et al. 2010). Alguns estudos mostram a existência de co-infecção de PIV em associação com o RhV em crianças mais pequenas (Paula et al. 2011), havendo estudos que evidenciam a relação do PIV com o MPV e a importância destes nas exacerbações de asma (Fujitsuka et al. 2011).

Actualmente, não há tratamento antivírico específico, nem está disponível nenhuma vacina contra nenhum dos PIV. O diagnóstico pode ser realizado por cultura celular, pela detecção de antígenos virais em secreções respiratórias, por serologia, imunofluorescência indirecta ou por técnicas de biologia molecular (Murray et al. 2007).

### 1.1.3 Metapneumovirus

Identificado em 2001, o Metapneumovirus (MPV) foi recentemente isolado por técnica de biologia molecular (2005). Causador frequente de doenças do trato respiratório superior e inferior em pessoas de todas as idades é, contudo, mais frequentemente isolado em crianças com idade inferior a 5 anos podendo provocar quadros de bronquiolite grave e pneumonia (Gillim-Ross and Subbarao 2006) (Jartti T. et al. 2002) (van Woensel et al. 2006).

Pertence à família *Paramyxoviridae*, subfamília *Pneumovirinae* género *Metapneumovirus*. (Kim S. et al. 2009).

O MPV é um vírus de RNA de cadeia simples, polaridade negativa, com invólucro lipoproteico, partículas virais com cerca de 150-600 nm de diâmetro (Maffey 2008). O invólucro bilipídico contém na sua superfície a proteína F, que medeia a fusão de invólucro viral com a membrana plasmática da célula, estando a proteína G envolvida na interacção vírus-célula (Murray et al. 2007).

Até há relativamente pouco tempo, os MPV dividiam-se em dois grupos distintos A e B e estes em dois subgrupos – A1 e A2; B1 e B2. Mais recentemente foi divulgado que o MPV apenas possui um serótipo com dois subgrupos genéticos A e B que tem extensa reactividade e protecção cruzada (Maffey 2008).

O ciclo de replicação do vírus ainda não é totalmente conhecido, havendo evidências que o assemelham ao do VSR. Uma diferença a salientar é que a cinética de infecção por MPV é mais lenta, ocorrendo o pico de expressão proteica intracelular entre 48 a 72 horas após a infecção. Os efeitos citopáticos do MPV são menos proeminentes comparativamente ao VSR (Maffey 2008).

É detectado predominantemente entre os meses de Setembro e Outubro (Warris and de Groot 2006). As infecções por MPV são muito similares clinicamente ao VSR, porém, apresentam menores alterações nos marcadores inflamatórios da nasofaringe,



traduzindo-se numa resposta inflamatória mais ligeira por parte do organismo (Smyth and Openshaw 2006) (McNamara et al. 2007).

Devido ao facto de ocorrerem na mesma época do ano que o VSR, existe uma probabilidade superior para a co-infecção entre VSR e MPV. A possibilidade de incrementação de potencial patogénico devido a co-infecções não é consensual e não está completamente esclarecida. Foi sugerido que a co-infecção entre MPV e VSR potencia a severidade do VSR, por alguns estudos e que esta co-infecção ocorre com mais frequência e com maior severidade em crianças com ventilação mecânica (van Woensel et al. 2006). Contrariamente, noutro estudo não foi demonstrada a associação destes vírus a crianças hospitalizadas (Kahn 2006).

A transmissão pode ocorrer por via directa e por aerossóis contaminados, e embora estejam descritos casos de infecção nosocomial provocada por MPV, não há estudos conhecidos de surtos na população pediátrica. A maioria dos surtos registados em unidades hospitalares por MPV envolve pacientes idosos em unidades de cuidados continuados (Kim S. et al. 2009).

O período de incubação varia de 3 a 5 dias a duração de excreção viral ainda não é de bem definida, pensando-se que se prolongue por semanas após a infecção primária (Murray et al. 2007).

Os sintomas das infecções respiratórias causadas pelo MPV são similares às causadas pelo VSR, podendo variar de moderados, em infecções respiratórias do trato superior, (sendo os sintomas mais comuns rinorreia, congestão nasal, faringite e tosse), a bronquiolite e pneumonia nos casos mais graves (Murray et al. 2007).

Nos últimos anos foram feitos estudos que mostraram a produção de anticorpos mono e policlonais que permitem neutralizar o MPV. Actualmente não há tratamento antivírico específico, nem está disponível nenhuma vacina contra MPV (Garcia 2007).

O diagnóstico pode ser realizado por culturas celulares, contudo, a sua detecção é dificultada devido ao fraco crescimento e fraco efeito citopático. O diagnóstico laboratorial também pode ser realizado por serologia, pela detecção de anticorpos

monoclonais (IFD), contudo, presentemente o PCR em tempo real (RT-PCR) é o único método confiável para a detecção de MPV (Matsuzaki et al. 2009) (Kesson 2007).

#### 1.1.4 Vírus Sincial Respiratório

O Vírus Sincial Respiratório (VSR) foi isolado em 1956, sendo hoje reconhecido como o agente viral mais importante nas infecções respiratórias das vias respiratórias inferiores em lactentes e crianças jovens de todo o mundo. É um agente ubiquitário, responsável por quadros de bronquiolite e pneumonia, assim como potencial causador de doença grave em idosos e imunocomprometidos (Selvarangan et al. 2008) (Nokes et al. 2008) (Cho et al. 2009).

Pertencente à família *Paramyxoviridae* e género *Pneumovirus*. É um vírus de RNA de cadeia simples, de polaridade negativa, composto por nucleocapside de simetria helicoidal e capsulado. É um agente pleomórfico, com cerca de 100 a 350 nm de diâmetro, codifica cerca de dez proteínas e duas glicoproteínas de superfície (Ogra 2004).

Divide-se em dois subgrupos antigénicos: VSR-A (considerado o mais virulento) e VSR-B, sendo este subdividido em duas variantes, B1 e B2 (Kesson 2007).

Das dez proteínas, oito estão presentes nas células infectadas assim como nos viriões, sendo portanto proteínas estruturais (Ogra 2004). A proteína SH (Small Hydrophobic Protein), a proteína M (proteína de matriz) e proteína M2 são as proteínas da cápsula. A nucleoproteína (N), a Fosfoproteína (P) e a grande Nucleoproteína (N) estão presentes na nucleocapside do VSR. As proteínas NS1 e NS2 não são proteínas estruturais, pois estão presentes apenas nas células infectadas, mas não nos viriões (Ogra 2004). A glicoproteína F tem como função a fusão do vírus às células do hospedeiro e a proteína G de tem a função de se ligar ao hospedeiro, sendo estes os principais alvos para a neutralização dos anticorpos do hospedeiro alvo (Munday et al. 2010a) (Sorce 2009).

O VSR entra no organismo replicando-se no epitélio respiratório destruindo as células epiteliais ciliadas, resultando na diminuição da depuração de muco e detritos, adicionalmente as células caliciformes podem produzir muco em quantidades anormais (Yilmaz et al. 1999). A população que apresenta maior risco de adquirir doença grave por VSR são as crianças prematuras e com doença pulmonar crónica. Em casos de fibrose

cística, doença cardíaca congénita, transplantados, doenças neuromusculares, e em indivíduos imunossuprimidos também existe um risco acrescido de infecção grave por VSR (Sorce 2009). Alguns estudos sugerem que as constipações comuns induzidas pelo VSR são mais severas e de maior duração do que as induzidas por outros vírus, tendo sido demonstrado que a mortalidade associada a infecção primária por VSR em crianças saudáveis é cerca de 0.005% a 0.020%. Em crianças hospitalizadas estes valores aumentam e oscilam entre 1 % e 3 % (Ogra 2004).

O VSR é um agente ubiqüitário, e em zonas temperadas os surtos por VSR ocorrem normalmente no Inverno e no início da Primavera, entre Outubro e Abril, (Yilmaz et al. 1999) com taxas de detecção em crianças de 70-85 % durante o Inverno (Paranhos-Baccala et al. 2008).

Os locais de entrada no organismo são principalmente a naso-orofaringe. A transmissão dentro da família é comum. É um agente frequente de infecções nosocomiais (Yilmaz et al. 1999). O VSR afecta quase todas as crianças até aos 2 anos, com um pico de incidência entre os 2-4 meses, altura em que os anticorpos maternos diminuem e aumenta o risco de re-infecções (Sorce 2009). Diversos estudos demonstraram que a infecção por VSR é universal nos primeiros anos de vida – infecta 70 % das crianças no primeiro ano e praticamente 100 % no segundo, sendo a maior parte das infecções localizadas apenas nas vias respiratórias superiores. O VSR é responsável por 70 % das hospitalizações por bronquiolite (Halfhide and Smyth 2008) (Carroll and Lenney 2007) (Pinto Mendes 2008).

O vírus tem um período de incubação de cerca de 2 a 8 dias. Em crianças mais velhas e adultos o VRS está frequentemente associado a infecções respiratórias do trato superior, sendo os sintomas mais comuns rinorreia, congestão nasal, faringites e tosse (Murray et al. 2007).

Em crianças com idade inferior a 2 anos ocorre frequentemente infiltração bronquiolar, edema da submucosa e formação de muco e consecutiva obstrução das vias respiratórias (Sorce 2009).

São usados no tratamento destas infecções broncodilatadores (epinefrina e  $\beta$ 2-agonistas), esteroides e antivirais como a ribavirina, sendo este último de utilidade clínica questionável, pois está limitado pelos possíveis efeitos colaterais de deterioração da função respiratória, indução de anemia e teratogenicidade (Sorce 2009) (Wang et al. 2009).

A vacina é evidentemente necessária, porém há apenas ensaios iniciais. Uma grande variedade de vacinas estão actualmente sob investigação, e incluem vacinas de vírus vivos atenuados, vacinas de polipeptídeos de DNA (Sorce 2009).

As incertezas sobre a eficácia da vacina surgem da incapacidade de evitar a re-infecção, que talvez possa estar relacionada com a diversidade antigénica e com a complexa interacção entre as infecções e imunidade (Nokes et al. 2008).

O diagnóstico pode ser realizado por culturas celulares, imunoflorescência indirecta (IFI), serologia, testes imunoenzimáticos e por técnicas de amplificação de ácidos nucleicos (PCR). As culturas celulares no passado foram as mais usadas para a detecção do VSR, porém a sua morosidade não permite que os resultados estejam disponíveis atempadamente para a decisão clínica (Selvarangan et al. 2008). Assim, os métodos de detecção molecular são hoje utilizados rotineiramente na detecção do VSR.

### 1.1.5 Coronavirus

O Coronavírus (CoV) foi identificado em meados do ano 1960. (Sloots et al. 2008). Pertence à Família *Coronaviridae* gênero *Coronavirus* (Murray et al. 2007).

O CoV é um vírus de RNA de cadeia simples com nucleocapside helicoidal, com tamanho médio entre 80-150 nm. Existem cinco CoV conhecidos capazes de infectar os humanos- CoV-OC43, CoV-229E, CoV (SARS-CoV), CoV -NL63 e CoV -HKU1 (Kesson 2007) (Maffey 2008).

Entre 2002-2003 surgiu um novo CoV responsável pela Síndrome Respiratória aguda (SARS - Severe Acute Respiratory Syndrome), que causa uma pneumonia atípica altamente contagiosa (Kesson 2007). A sua rápida propagação traduziu-se em morbidade e mortalidade em todo o mundo, infectou cerca de 8464 pessoas em 29 países diferentes, causando cerca de 800 mortes (Cheng et al. 2007) (Espy et al. 2006) (Munday et al. 2010).

Em 2004, foi comunicado por Van der Hoek et al. a identificação de um novo CoV em crianças com bronquiolite denominado por CoV-NL63. Logo de seguida, em 2005, foi identificado o CoV-HKU1 associado a doença pulmonar crónica em adultos (Sloots et al. 2008). Estes últimos vírus causam infecções comuns aos CoV 229E e CoV OC43, não sendo considerados emergentes como o SARS-CoV (Dijkman and van der Hoek 2009). Com base em características serológicas e genótípicas o CoV foi dividido em três grupos distintos: CoV229E e CoVNL63 do grupo 1, CoVOC43, SARS-CoV e CoVHKU1 do grupo 2. No grupo três estão inseridos os CoV não patogénicos para humanos (Murray et al. 2007).

Pensa-se que o Coronavirus entra nas células, predominantemente, por endocitose através de receptores específicos, ocorrendo a replicação no citoplasma. Os receptores para o CoV são aminopeptidase-N (CoV-229E) e o ácido siálico (CoV-OC43). Após a entrada do vírus na célula hospedeira, o genoma é transcrito e depois traduzido (Tyrrell and Myint 1996). Alguns estudos demonstram que os CoV são extremamente exigentes e crescem apenas em células epiteliais respiratórias diferenciadas. As células após serem

infectadas tornam-se vacuolizadas, exibindo os cílios danificados podendo mesmo formar sincícios. O dano celular desencadeia a produção de mediadores inflamatórios, que aumentam a secreção nasal e causam inflamação (Tyrrell and Myint 1996).

A principal via de transmissão é de pessoa para pessoa por gotículas contaminadas. Acredita-se que a emergência do SARS-CoV na população humana resulta de transmissão zoonótica, inicialmente originária em morcegos, transmitida aos humanos por gatos (Gillim-Ross and Subbarao 2006) (Wohlford-Lenane et al. 2009) (Cheng et al. 2007).

O período de incubação varia 2 a 5 dias, sendo a excreção viral pelo trato respiratório superior, alta, durante os primeiros 4 dias de infecção sendo o pico por volta do décimo dia da doença (Murray et al. 2007).

O CoV parece estar associado a 10-15 % das infecções respiratórias do trato superior, podendo ser causa das constipações comuns e otites médias (Kesson 2007). As infecções por CoV ocorrem esporadicamente em todo o mundo durante o Inverno e Primavera, em qualquer idade, sendo predominante em crianças e causa de re-infecções recorrentes (Maffey 2008). Com excepção dos SARS-CoV, raramente são causadores de pneumonias (Kesson 2007).

Não existem antivirais específicos nem vacinação disponível para a terapia de CoV, o diagnóstico laboratorial pode ser efectuado por cultura celular, ou por técnicas moleculares (Nichols et al. 2008) (Kesson 2007). Vários métodos moleculares tem sido desenvolvidos para detectar e quantificar SARS-CoV em amostras respiratórias (Wang W. K. et al. 2005).

### 1.1.6 Bocavirus

O Bocavírus (BoV) foi descrito em 2005, na Suíça, após ter sido detectado em crianças com dificuldades respiratórias, muitas delas com pneumonias e infiltrados intersticiais observados em radiografias torácicas (Kesson 2007).

Pertence à família *Parvoviridae*, sub-família *Parvovirinae*, género *Bocavirus* (Schildgen et al. 2008). É um vírus de DNA de cadeia simples sentido negativo, com aproximadamente de 4000-6000 nucleotidos, 20 nm de diâmetro, cápside icosaédrica e sem invólucro (Schidgen, Muller et al.2008) (Catalano-Pons, Vallet et al.2009).

A sua variabilidade genética é baixa, até ao momento conhecem-se duas variantes que circulam simultaneamente sendo a sua distribuição universal. O genoma do vírus codifica para quatro proteínas: proteínas não-estruturais (NS1 NP-1) e proteínas da capsíde viral (VP1,VP2) (Catalano-Pons et al. 2009) (Schildgen et al. 2008). A maioria das variações genéticas ocorre nestas proteínas da cápside (VP1/VP2) permitindo a classificação do BoV nos dois genótipos, ST1 e ST2 (Wang K. et al. 2010).

Na ligação do vírus às células hospedeira, o BoV liga-se a um ou mais receptores presentes na célula hospedeira, o genoma viral DNA de cadeia simples (ssDNA) é transportado para o núcleo, onde é convertido em DNA de cadeia dupla. A transcrição de mRNA viral ocorre, em geral, apenas durante a fase S do ciclo celular do hospedeiro, levando à síntese de proteínas virais. As várias proteínas são sintetizadas no citoplasma e posteriormente exportadas para o núcleo onde ocorre a montagem do vírus. Os vírus são libertados da célula hospedeira por lise celular (Dijkman et al. 2009).

Em regiões de clima temperado é observada uma maior ocorrência de detecção de BoV durante os meses de Inverno e Primavera, (Schildgen et al. 2008) embora existam relatos de ocorrência relativamente alta no fim da Primavera e início do Verão (Hindiyeh et al. 2008).



Não se sabe muito sobre a transmissão de BoV, porém, dado o elevado número de cópias virais existentes nas secreções respiratórias, pensa-se que os aerossóis, à semelhança dos outros agentes, são o maior veículo de transmissão (Schildgen et al. 2008).

Os sinais clínicos mais comuns são: tosse, rinorreia, sibilância e febre (Catalano-Pons et al. 2009). Pode ainda ser detectado em crianças com sintomas que incluem vômitos e diarreia (Martin et al. 2009).

A idade mais frequente para a primeira infecção por BoV ocorre por volta dos 6-8 meses e a maioria das crianças infectadas tem idade inferior a um ano, contudo a infecção pode ocorrer em crianças com idade superior (Jartti L. et al. 2011) (Schildgen et al. 2008). A detecção de BoV em crianças com menos de 5 meses é quase inexistente, sugerindo protecção por anticorpos maternos (Catalano-Pons et al. 2009). O BoV raramente é detectado em adultos imunocompetentes, mas é frequentemente detectado em adultos imunossuprimidos. Contudo, alguns estudos sugerem que a presença nestes sujeitos poderá ser o resultado de re-infecções, persistência ou reactivação viral (Sloots et al. 2008).

Vários estudos avaliaram a detecção simultânea do BoV com outros vírus e demonstraram um grau de co-infecção elevado, sendo frequentemente detectado em associação com outros vírus respiratórios com quem estabelecem um potencial patogénico. As associações mais frequentes são estabelecidas com o VSR e RhV (Catalano-Pons et al. 2009) (Schildgen et al. 2008). Foi demonstrado que o BoV aumentou a severidade de bronquiolite em crianças com idade inferior a um ano de idade quando co-infectadas com o VSR (Midulla et al. 2010).

Não existem até à data agentes antivirais descritos para o tratamento de BoV nem vacinação disponível (Nichols et al. 2008).

O diagnóstico laboratorial é realizado por técnicas de amplificação de ácidos nucleicos (PCR); podendo ser detectado em vários fluidos biológicos como aspirados nasofaríngeos (Wang K. et al. 2010). Não é possível detectar o BoV por culturas celulares (Schildgen et al. 2008).

### 1.1.7 Adenovirus

Os Adenovirus (AdV) foram inicialmente isolados e caracterizados em 1953, após terem sido responsáveis por surtos de doença respiratória aguda em recrutas militares, designando-se por ARD – “Acute Respiratory Disease of Recruits”, sendo os serótipos responsáveis pela infecção o 4 e 7 (Lee J. A. et al. 2005) (Metzgar et al. 2009).

Pertencem à família *Adenoviridae* género *Mastadenovirus*. São vírus de DNA cadeia dupla, com cerca de 70-90 nm envoltos por uma cápside icosaédrica, com projecções que se estendem por cada um dos doze vértices (Damen et al. 2008) (Kesson 2007) (Luiz et al. 2010).

Com base na sua estrutura biológica e genética são agrupados em sete subgrupos de A-G, existindo no total 55 subtipos diferentes de adenovirus (HAdV-1-55) (Mandelboim et al. 2011) (Robinson et al. 2011). Os subtipos relacionados com infecções respiratórias em humanos são: 1,2,3,4,5,6,7,14 e 21, sendo os serótipos 1,2,e 5 os mais frequentes em crianças (Steer et al. 2009) (Dey et al. 2011).

A distinção dos subgrupos é particularmente relevante na patogenicidade das infecções. Os subgrupos C, E e alguns B são normalmente responsáveis por infecções respiratórias, enquanto os subgrupos A e F estão relacionadas com infecções do trato gastrointestinal, o subgrupo D está associado a infecções oculares (Stroparo et al. 2010).

A identificação do agente etiológico e dos subtipos específicos está frequentemente associada à manifestação e severidade da doença. Recentemente surgiu nos E.U.A. o subtipo HAdV-14 que rapidamente se tornou o mais prevalente e causa de doença agravada (Luiz et al. 2010). A prevalência dos diferentes serótipos de AdV varia entre as diferentes regiões (Abd-Jamil et al. 2010). São detectados com alguma frequência em crianças e jovens assintomáticos, sendo causa de surtos de pneumonia viral em crianças que frequentam infantários e escolas (Forbes et al.2008) (Kesson 2007).

Alguns estudos mostram que em idade pediátrica, cerca de 5-10 % das infecções respiratórias inferiores estão associadas a AdV, tendo mesmo sido reportados casos de morte por pneumonia associada ao serótipo 11 e 35 (Kunz and Ottolini 2010) (Houng et al. 2010).

A entrada do vírus na célula envolve alta afinidade das fibras virais com o receptor celular primário denominado CAR (Coxsackie/Adenovírus Receptor). A entrada do vírus na célula ocorre por endocitose mediada pelas integrinas e pela proteína *penton-base*. Uma vez dentro da célula, o vírus escapa dos endossomas com a ajuda da *penton-base* (interage com este último), deslocando-se para o núcleo, onde o DNA viral é libertado iniciando-se a transcrição. A replicação viral ocorre no núcleo da célula infectada (Russell 2000).

Nas regiões de clima temperado a incidência de infecções por AdV é alta durante todo o ano, com uma ligeira diminuição durante os meses de Verão (Olofsson et al. 2011).

Consoante os quadros clínicos que causam os AdV podem ser transmitidos por via fecal-oral ou por gotículas de saliva infectadas (Metzgar et al. 2009). Apresentam um período de incubação de cerca de 5 a 6 dias (Kunz and Ottolini 2010).

Os sintomas associados a infecção respiratória por AdV podem incluir sintomas de constipação comum, faringites e em alguns casos mais graves, pneumonia e/ou bronquiolites (Tan et al. 2010). As pneumonias causadas por infecção por AdV são geralmente graves, especialmente causadas pelo serótipo sete, estando porém, associados a um menor número de surtos de doenças do trato respiratório. A última análise global revela que um quinto de todas as infecções por AdV declaradas à OMS está associada ao serótipo sete. As doenças relatadas incluem doença do trato respiratório e conjuntivite, em lactentes e imuno-comprometidos, podendo causar surtos de doença grave, e em alguns casos levar à morte (Tang et al. 2011).

Actualmente não existe vacina para a profilaxia, podendo o cidofovir ser utilizado no tratamento das infecções agudas por AdV com sucesso moderado em doentes imunocomprometidos (Kunz and Ottolini 2010).

O diagnóstico laboratorial pode ser realizado por cultura celular, detecção de antígenos por imunofluorescência indirecta, serologia ou por técnicas de amplificação de ácidos nucleicos (PCR).

### 1.1.8 Rhinovirus

O Rhinovirus (RhV) foi inicialmente isolado em culturas celulares em 1956. Durante muito tempo pensou-se estar apenas na origem de constipações comuns, porém, actualmente sabe-se que está associado a infecções do trato respiratório inferior em lactentes e exacerbações de asma em crianças e em adultos (Choi et al. 2006) (Piralla et al. 2009) (McErlean et al. 2007).

Pertence à família *Picornaviridae*, género *Rhinovirus* (McErlean et al. 2007). É um vírus de RNA de cadeia simples, com cerca de 24-30 nm de diâmetro com mais de 100 serótipos identificados. Distingue-se dos Enterovírus pela sua inibição a pH inferior a 5, não tendo a capacidade de infectar o trato gastrointestinal (Kesson 2007) (Miller et al. 2009b) (Maffey 2008).

O RhV é classificado em três espécies distintas, incluindo o RhV-A (76 serótipos), RhV-B (inclui 25 serótipos) e RhV-C (Piralla et al. 2009).

A resposta imune inata à infecção por RhV foi postulada como sendo deficiente em pacientes asmáticos. Deste modo, a diminuição da imunidade provoca lise celular e origina sintomas mais graves. A infecção por RhV pode actuar sinergicamente com a inflamação alérgica aumentando o risco de hospitalização em crianças com asma (Warren 2009).

A replicação do RhV ocorre inicialmente nas células epiteliais ciliadas do nariz com um período de incubação que varia entre 2 a 3 dias (Murray et al. 2007).

Ao entrar no organismo hospedeiro invade as vias aéreas inferiores aumentando a resposta inflamatória e a hiper-reactividade das vias aéreas (Lehtinen et al. 2007).

Após a ligação do vírus à célula hospedeira, o RNA viral no citoplasma é reconhecido e traduzido pela síntese de proteínas celulares. A tradução viral é seguida pela replicação de RNA dando origem a grandes quantidades destas moléculas, algumas das quais podem servir como novos mRNAs para direccionar a síntese de proteínas virais durante a fase

tardia da infecção. Esta tradução viral é acompanhada por uma inibição profunda da síntese proteica celular (Welnowska et al. 2011).

A prevalência do RhV é elevada entre Outubro a Abril, havendo uma notória diminuição da circulação do vírus no Verão. Porém, são os agentes que com maior frequência provocam síndromas respiratórias agudas nesta altura do ano (Miller et al. 2009) (Maffey 2008).

O RhV está presente em altos títulos na mucosa nasal de pessoas contaminadas que frequentemente contaminam as mãos. Deste modo, a transmissão do RhV pode ocorrer de pessoa para pessoa directamente através da emissão de aerossóis ou indirectamente através de objectos contaminados (Murray et al. 2007).

O período de incubação do vírus ronda 2 a 3 dias, o significado clínico da detecção de RhV em doentes assintomáticos tem sido questionado, estando descrito que o vírus persiste no organismo em 50 % dos casos duas semanas após infecção aguda (Freymuth et al. 2006).

O RhV é o agente etiológico mais comum de infecções respiratórias superiores, e com alguma regularidade, causa doença ligeira auto-limitada referida como a constipação comum (Wisdom et al. 2009). Estudos demonstraram ser o segundo vírus mais comum a desencadear sibilância precoce em 45 % dos casos das hospitalizações (Lehtinen et al. 2007).

Em hospital, foi ainda demonstrado que durante um determinado período de tempo, a causa de internamento por infecção respiratória aguda em cerca de 26 % das crianças com menos de 5 anos, estava associado a RhV (Miller et al. 2009).

Recentemente o RhV-C tem sido repetidamente detectado em doentes com infecção do trato respiratório inferior (Piralla et al. 2011).

Alguns estudos evidenciam o RhV como uma profilaxia natural extremamente valiosa para a inibição de possíveis infecções virais por outros vírus potencialmente mais patogénicos (Greer et al. 2009).

Não há tratamento etiológico nem vacinas disponíveis para as infecções por RhV. Até à data várias abordagens têm sido ensaiadas e incluem inibidores de ligação viral, com o consequente impedimento de entrada no hospedeiro, e inibidores da síntese de proteases virais (Nichols et al. 2008).

O diagnóstico é feito pela detecção de RNA viral, por técnicas de amplificação de ácidos nucleicos (PCR).

### 1.1.9 Enterovirus

Os Enterovirus (EV) foram identificados em 1956 e são causa comum de doença em todo o mundo, estando associados a diversos síndromas clínicos, incluindo infecções assintomáticas, doenças respiratórias, gastroenterite e meningite (Yozwiak et al. 2010).

Pertencentes ao género Enterovirus família *Picornaviridae*, (Mahony 2008) os EV são vírus de RNA, cadeia simples, sem invólucro. Estão divididos em 65 serótipos classificados em quatro espécies (EV-A; EV-B; EV-C; EV-D) (Murray et al. 2007).

Tal como os RhV apresentam uma organização genómica idêntica, têm estruturas semelhantes, e são classificados dentro do mesmo género por causa de sua alta homologia de sequências. Apesar das suas características genómicas comuns, estes dois grupos de vírus têm diferentes características fenotípicas. Os EV diferem do RhV pela sua temperatura de crescimento, tolerância ao pH ácido e tropismo celular, contudo a base genómica que justifica as diferenças fenotípicas entre vírus semelhantes, ainda não é totalmente compreendida (Tapparel et al. 2009).

Os EV são agentes ubiqüitários encontrados em todo o mundo, em conjunto com os RhV são os principais causadores de infecção em humanos (Murray et al. 2007).

*In vivo*, as infecções por RhV são restritas ao trato respiratório, enquanto os EV além do sistema respiratório podem infectar o trato gastrointestinal e podem alastrar-se a outros sistemas, como o sistema nervoso central (consoante o subtipo). Alguns EV apresentam tropismo específico e propriedades respiratórias semelhantes aos RhV (Tapparel et al. 2009).

Após inalação ou ingestão do EV, o vírus reconhece na superfície da célula hospedeira uma molécula de superfície ao qual se liga, entra na célula hospedeira e o material genético é libertado no citoplasma desta. A replicação viral ocorre no núcleo da célula infectada (Murray et al. 2007).



A maioria das infecções por EV ocorre no final do Verão e Outono. São geralmente infecções assintomáticas, que podem ser responsáveis por síndromas infecciosas, incluindo infecções do trato respiratório superior (sinusite, faringite, otite média) ou inferior (pneumonia, bronquiolite ou exacerbação da asma na infância). Estudos recentes referem que os EV são a terceira causa de bronquiolite viral em crianças de 1 a 12 meses (Kesson 2007).

Os dados epidemiológicos actuais e a capacidade de rápida evolução genética das estirpes de EV são indicadores da emergência do vírus, assim como do elevado potencial patogénico para os humanos (Andreoletti et al. 2009).

A transmissão da maior parte das infecções respiratórias por Enterovirus ocorre por transmissão de partículas respiratórias como aerossóis e por contacto directo. (Mahony 2008).

Quando os Enterovirus causam doença, as manifestações clínicas variam muito e podem incluir doença respiratória superior ligeira, doença exantemática febril, e doenças neurológicas, como meningite asséptica e encefalite (2011).

O diagnóstico laboratorial é efectuado por serologia e detecção de RNA viral por técnicas de amplificação de Ácidos nucleicos (PCR).

Actualmente ainda não existem agentes antivirais nem vacinas avaliados para o tratamento de infecções respiratórias por Enterovirus (Murray et al. 2007).

## 1.2. Transmissão dos Vírus Respiratórios

---

As diferentes vias de transmissão viral podem ajudar a compreender o curso e a importância das infecções respiratórias. A transmissão dos vírus que provocam infecções respiratórias pode ocorrer através de diferentes vias, contacto directo com pessoa contaminada; contacto com superfícies contaminadas; inalação de aerossóis resultantes da fala, tosse, espirro e águas contaminadas (Murray et al. 2007).

Os vírus influenza podem persistir em superfícies por mais de duas horas, sendo que o frio e a humidade aumentam a sua sobrevivência. As baixas temperaturas e a elevada humidade, que se verifica no Inverno, associadas a factores como a ventilação reduzida e a aglomeração de pessoas em ambientes fechados, facilitam a transmissão da infecção (McDevitt et al. 2010).

Após a inalação dos aerossóis estes vão depositar-se nas superfícies mucosas do aparelho respiratório superior (boca e nariz) do hospedeiro susceptível.

Pensa-se que as crianças funcionam como um “reservatório” viral, sendo estas as primeiras a ser infectadas por vários vírus causadores de infecções respiratórias, como vírus influenza, vírus sincicial respiratório, ou rinovirus. Estas podem ser infectadas na escola por causa dos inúmeros contactos próximos que ocorrem entre crianças em idade escolar, e então agir como fontes de infecção em casa onde as infecções se podem disseminar ainda mais na comunidade. Estudos de crianças hospitalizadas com infecção respiratória aguda, fornecem informação sobre a duração de excreção viral, tendo sido demonstrado que uma maior gravidade da infecção resulta do aumento da duração de excreção viral (Stehle et al. 2011).

Uma consideração importante para a patogénese das doenças infecciosas adquiridas por aerossóis é a penetração destes no trato respiratório. Partículas com 5 µm de diâmetro, ou menos, têm uma penetração significativa no trato respiratório chegando facilmente até a região alveolar (30 %). Para partículas superiores a 5 µm a penetração na região alveolar diminui. A penetração é ainda significativa na região traqueobrônquica para

partículas na gama de 5-10  $\mu\text{m}$  (50 %), e diminui rapidamente depois disso. Para partículas com diâmetro igual ou superior a 20  $\mu\text{m}$  não há penetração abaixo da traqueia. O conceito de penetração é diferente da deposição e somente uma fracção das partículas penetrantes serão depositadas, sendo as restantes expulsas durante a respiração normal. Estas partículas podem ser expelidas através da fala, tosse e espirros e podem permanecer no ar por alguns minutos ou horas, dependendo do tamanho e densidade (Tellier 2009) (Macinnes et al. 2011).

As partículas estranhas que entram na cavidade nasal ou no trato respiratório superior ficam presas no muco e são levados para a parte posterior da garganta, onde são engolidos. Se as partículas atingem o trato respiratório inferior, podem também ser retidas no muco, que é eliminado pela acção ciliar. Os alvéolos são sacos para troca gasosa desprovidos de cílios, no entanto, são dotados de macrófagos cuja função é a digestão de partículas estranhas ao organismo. Para que um vírus estabeleça com sucesso uma infecção nas vias respiratórias, deve ser capaz de superar os efeitos inibitórios de barreiras físicas, a distância, as defesas do hospedeiro, e diferentes susceptibilidades celulares à infecção. Os efeitos inibitórios são geneticamente controlados e, portanto, podem variar entre indivíduos e raças (Baron et al. 1996).

### **1.3. Patogénese das Doenças Respiratórias Víricas**

---

As infecções respiratórias agudas (IRA) afectam as vias aéreas, e quando associadas a factores de agravamento tais como asma, pneumonia, bronquiolite, entre outras, justifica-se o recurso a terapêuticas farmacológicas e internamento hospitalar. De acordo com a sua topografia e localização, as (IRA) distinguem-se em dois grandes grupos, as infecções do trato respiratório superior e as infecção do trato respiratório inferior.

#### **1.3.1. Infecção do Trato Respiratório Superior**

Provocam sintomas semelhantes aos do resfriado comum como tosse, congestão nasal, rouquidão, otites, e faringites (Tregoning and Schwarze 2010). Alguns estudos demonstraram que o VSR é causa de otite média em aproximadamente 15 % dos casos (Nichols et al. 2008).

Estas infecções são geralmente autolimitadas, com uma média de duração de 9 a 10 dias, estando muitos vírus associados a este síndrome. Cerca de 40 % dos resfriados estão associadas ao Rhinovirus, podendo no entanto ser provocados por outros vírus, com o Coronavirus e Enterovirus (Kesson 2007). A maior parte das faringites são causadas por PIV (Nichols et al. 2008).

#### **1.3.2. Infecção do Trato Respiratório Inferior**

Cerca de um terço das crianças com infecções respiratórias virais desenvolve sintomas tais como sibilância, tosse intensa, e dificuldade respiratória (Tregoning and Schwarze 2010). A bronquiolite e pneumonia são manifestações clínicas do trato respiratório inferior devido a infecção viral. Os vírus respiratórios constituem cerca de 70 % dos agentes etiológicos causadores de pneumonia adquirida na comunidade em crianças,

sendo o VSR, AdV, INFA, INFB e PIV, os vírus mais frequentemente detectados nestas patologias (Smyth and Openshaw 2006).

#### **1.3.2.1. Bronquiolite**

É uma doença endémica com um pico epidémico que ocorre durante o Inverno em países temperados. Alguns estudos demonstraram que a bronquiolite é a causa mais comum de hospitalização no primeiro ano de vida. Entre os 2-6 meses, cerca de 2-3 % das crianças recorre ao hospital com esta patologia (Paranhos-Baccala et al. 2008) (Kesson 2007). Caracteriza-se por uma inflamação dos bronquíolos que conduz a uma síndrome clínica caracterizada por obstrução do fluxo aéreo expiratório, geralmente precedido por congestão nasal e rinorreia. É o quadro clínico mais comum e severo na infecção respiratória inferior durante os primeiros anos da infância. Aproximadamente 75-85 % dos casos de bronquiolite foram atribuídos a infecções pelo VSR; 10-20 % a RhV ou PIV. Neste estudo em 10 % dos casos de bronquiolite não foram detectados quaisquer patógenos (Semple et al. 2005). O Metapneumovirus é reconhecido como o maior patógeno causador de bronquiolite na ausência de outros patógenos (Semple et al. 2005).

#### **1.3.2.2. Pneumonia**

Definida pelo desenvolvimento de anormalidades nos alvéolos, acompanhado pela inflamação do parênquima pulmonar, a pneumonia apresenta normalmente mudanças visíveis no exame radiológico, sendo causa importante de morbilidade e mortalidade em indivíduos com o sistema imunitário comprometido (Kesson 2007).

O VSR tem sido associado a pneumonia viral em crianças jovens, os vírus PIV3, INFA e INFB são causas significantes de pneumonia, especialmente em períodos de prevalência epidémica. Outros estudos demonstraram que o AdV está

implicado em cerca de 10 % de pneumonias em crianças jovens, e o RhV está associado a pneumonia adquirida da comunidade (Kesson 2007).

Na pneumonia adquirida da comunidade existem evidências de infecção simultânea de bactérias e vírus. Nos adultos esta situação clínica pode corresponder a 15 % do total dos casos, enquanto nas crianças corresponde a cerca de 45 %. A combinação mais frequente ocorre entre o *Streptococcus pneumoniae* e o vírus influenza A ou RhV (Jartti L. et al. 2011).

### **1.3.3. Asma**

A asma é uma doença inflamatória crónica das vias respiratórias distais, e em indivíduos susceptíveis os vários estímulos produzem uma hiper-resposta brônquica que provoca episódios recorrentes de sibilância, dispneia e pressão torácica (Warren 2009).

A causa de asma é muitas vezes heterogénea, havendo uma forte ligação entre o reflexo da contribuição do meio ambiente, predisposição genética e infecções adquiridas. Outro aspecto de infecção respiratória viral pediátrica ligada ao sistema imunológico é o desenvolvimento de asma após bronquiolite, parece existir uma forte correlação entre bronquiolite viral infantil e sibilância no final da infância (Tregoning and Schwarze 2010).

Alguns estudos demonstraram que as infecções virais são a mais frequente e importante causa de exacerbações de asma em crianças, estando associados o rinovírus, adenovírus, vírus sincicial respiratório e vírus influenza (Yasuda et al. 2005).

## **1.4. Prevenção da Infecção por Vírus Respiratórios**

---

### **1.4.1. Medidas Básicas de Higienização**

Estas medidas passam pelo cumprimento de normas de controlo de infecção relacionadas com normas básicas de higiene pessoal, como a lavagem frequente das mãos, pela desinfecção de superfícies, bem como normas de distanciamento social em casos de gripe sazonal.

### **1.4.2. Vacinas**

Historicamente, as estratégias de imunização pelas vacinas têm-se mostrado como as mais eficazes para controlar as infecções virais. Com o advento de novos vírus, vírus re-emergentes, e a ameaça de pandemias virais, tornou-se mais evidente, a necessidade de implementar medidas de contingência assim como o estudo de possíveis novas vacinas (Langley and Faughnan 2004).

No caso do vírus influenza existem dois tipos de vacinas utilizadas na prevenção, vacina inactivada (disponível desde 1940) administrada através de injeção intramuscular, pode ser dada a partir dos seis meses de vida, e a vacina com vírus vivos atenuados, desenvolvida na década de 1960, de administração intranasal (Fiore et al. 2009).

A vacina contra a gripe sazonal, que contém três vírus vivos (dois do tipo A e 1 do tipo B) é eficaz e normalmente bem tolerada em crianças (Carter and Curran 2011). As vacinas contra a gripe sazonal oferecem uma protecção por um tempo limitado (inferior a um ano) tendo de ser repetida após este período de tempo, a composição da vacina da gripe é alterada todos os anos consoante a previsibilidade dos vírus em circulação para esse ano definido pela OMS.

As vacinas licenciadas e comercializadas em Portugal para a época de 2011/2012, segundo orientação da Direcção-Geral de Saúde (DGS), e de acordo com a recomendação

da Organização Mundial da Saúde (OMS), têm a seguinte composição: uma estirpe viral A (H1N1) idêntica a A/California/7/2009; uma estirpe viral A (H3N2) idêntica a A/Perth/16/2009; uma estirpe viral B idêntica a B/Brisbane/60/2008. (<http://www.spp.pt/noticias/default.asp?IDN=241&op=2&ID=132>)



## **1.5. Tratamento de Infecções Virais Respiratórias**

---

Actualmente existem no mercado antivirais disponíveis para o tratamento de infecções respiratórias causadas por vírus influenza, vírus parainfluenza e vírus sincicial respiratório.

As drogas antivirais específicas, por exemplo Amantadina, Rimantadina, Oseltamivir e Zanamivir dirigidas contra os vírus da gripe (provocadas pelos vírus influenza), estão também associados ao aparecimento de estirpes de vírus resistentes aos antivíricos (Langley and Faughnan 2004).

### **1.5.1. Fármacos utilizados para infecções respiratórias por vírus influenza**

Actualmente existem quatro fármacos para o tratamento e profilaxia de infecções respiratórias provocadas por vírus influenza, que apresentam mecanismos de actuação diferentes.

#### **1.5.1.1. Amantadina e Rimantadina**

A amantadina e rimantadina foram os primeiros fármacos a ser aprovados tanto para o tratamento como para a profilaxia de infecção respiratória por vírus influenza A. São agentes antivirais sintéticos que actuam na inibição da proteína M2, (proteína membrana que funciona como canal iónico) bloqueando o canal iónico, impedindo a descapsulação viral, inibindo assim a sua síntese. É utilizado para a profilaxia e tratamento das infecções respiratórias, especialmente em paciente de alto risco (Suzuki et al. 2010).

#### **1.5.1.2. Oseltamivir e Zanamivir**

Actuam como inibidores das neuraminidases, utilizados em infecções por influenza A e influenza B, são licenciados como medicamentos antivirais para pacientes com idades entre 1 e 5 anos (Tregoning and Schwarze 2010).

#### **1.5.2. Fármacos utilizados para infecções respiratórias por vírus parainfluenza**

A ribavirina é um análogo sintético da guanosina, que actua na inibição da RNA polimerase, tem sido utilizada para o tratamento de infecções respiratórias por PIV em doentes imunossuprimidos, porém a sua administração e eficácia para infecções com este vírus não é consensual (Murray et al. 2007).

#### **1.5.3. Fármacos utilizados para infecções respiratórias por VSR**

A ribavirina possui actividade antiviral de largo espectro, e está aprovada para uso em infecções das vias respiratórias inferiores por VSR, contudo o seu uso é controverso e limitado pela eficácia insuficiente, elevado custo e efeitos secundários teratogénicos. (Tregoning and Schwarze 2010).

## **1.6. Diagnóstico das Infecções por Vírus Respiratórios**

---

O diagnóstico etiológico rápido e eficaz é crucial para o início de terapêutica antiviral adequada, evitando o recurso a terapêutica antimicrobiana desnecessária, prevenindo infecções nosocomiais, diminuindo a duração de estadia hospitalar e reduzindo os custos (Li et al. 2007).

Até há pouco tempo o diagnóstico laboratorial das infecções respiratórias de etiologia viral era realizado por culturas celulares, testes serológicos e detecção de antígenos virais. Presentemente, algumas técnicas moleculares estão implementadas com sucesso nas rotinas laboratoriais, permitindo de uma forma rápida e sensível a detecção simultânea dos vírus causadores de infecção respiratória (Kim S. R. et al. 2009)( Balada-Llasat et al. 2011).

### **1.6.1 Culturas Celulares**

A cultura celular foi uma técnica muito utilizada na identificação de vírus respiratórios no passado. Por ser uma técnica morosa e de difícil execução, e por nem todos os agentes virais causadores de infecção respiratória crescerem em linhas celulares (ou crescerem de um modo fastidioso) esta técnica é actualmente pouco ou nada utilizada na rotina laboratorial, pois cada vez mais se pretende a obtenção de resultados em tempo clinicamente útil (Kesson 2007) (Loeffelholz and Chonmaitree 2010).

### **1.6.2. Testes Imunocromatográficos**

Os métodos imunocromatográficos para identificação de vírus respiratórios têm sido desenvolvidos nos últimos anos e são utilizados para a detecção de antígenos virais em amostras clínicas.

São de fácil execução não requerendo equipamentos específicos nem pessoal especializado, são técnicas rápidas permitindo obter resultados em 15-20 min.

Estas técnicas são utilizadas frequentemente na pesquisa de VSR, porém, um resultado negativo na prova não exclui a possível infecção por VSR, nem a presença de infecção respiratória causado por outro vírus.

### **1.6.3. Serologia**

Os métodos serológicos de detecção de anticorpos antivirais não são de eleição para o diagnóstico de infecções respiratórias devido à sua baixa sensibilidade e ao facto de que a resposta imune-humoral a estes vírus que não produzem viremia é, em geral, de escassa magnitude. Por outro lado, a necessidade de usar amostras de soro (ou seja, amostras do período agudo e de convalescença) faz com que o resultado não influencie na terapêutica a instituir. Contudo, o diagnóstico serológico é útil em estudos epidemiológicos, na avaliação de vacinas e em ensaios clínicos de novos antivirais. Em geral, a técnica ELISA para detectar anticorpos IgG em soros é um método serológico mais sensível para diagnosticar as IRA de origem viral. Os métodos serológicos com detecção de anticorpo IgM são sugestivos de infecção recente (Forbes et al.2008).

### **1.6.4. Imunofluorescência**

As técnicas de imunofluorescência (IF) utilizadas na rotina laboratorial são bastante úteis na detecção de vírus respiratórios, fornecendo resultados em tempo clinicamente útil.

A metodologia de IF apresenta resultados com relativa rapidez, mas menos sensíveis que a cultura celular, podendo os resultados ser influenciados pela qualidade da amostra (presença de células intactas), tipo de vírus e pela subjectividade na interpretação dos resultados que está dependente da habilidade técnica do observador (Syrmis, Whiley et al. 2004).

Tem sido frequentemente utilizada na rotina laboratorial para a detecção de vírus respiratórios. A técnica tem como vantagem, além da rapidez de execução, baixo custo e fácil implementação na rotina laboratorial, porém, é limitada no número de vírus que detecta e na sensibilidade.

Normalmente esta técnica é constituída por painéis que permitem a detecção simultânea de um número variável de vírus respiratórios. Estes painéis são constituídos por anticorpos monoclonais dirigidos contra os vírus respiratórios. A técnica de imunofluorescência é utilizada para a identificação de vírus respiratórios patogénicos em culturas de células infectadas ou, directamente, em amostras biológicas (Forbes et al.2008).

#### **1.6.5. Métodos Moleculares**

Os métodos moleculares têm revolucionado o diagnóstico das doenças respiratórias virais, não apenas pelo elevado nível de sensibilidade na detecção, mas também pela capacidade de detectar simultaneamente um grande número de agentes, a um custo razoável.

Cada vez mais os laboratórios de diagnóstico laboratorial optam pela utilização quase exclusiva de métodos moleculares para a detecção de vírus respiratórios; seja utilizando PCR em tempo real, PCR Multiplex ou *microarrays*. A sensibilidade analítica, a rapidez e a crescente disponibilidade de novas técnicas moleculares são uma mais-valia na sua utilização. Utilizando variantes destes métodos existe hoje uma ampla gama de kits comerciais para a detecção de vírus em amostras respiratórias (Olofsson et al. 2011).

O PCR Multiplex é uma variante do PCR convencional capaz de detectar múltiplos agentes, e tem sido utilizado para detectar a presença de vírus causadores de infecção respiratória. Para alcançar um alto nível de especificidade na ligação dos *primers* é necessário fazer uma pesquisa elaborada e uma optimização de todos os parâmetros da reacção de PCR, podendo mesmo assim ocorrer ligações não específicas (Chun et al. 2007).

O formato Multiplex apresenta-se como uma melhoria significativa do PCR convencional, baseando-se na incorporação de vários pares de *primers* (respectivos dos vírus a amplificar), permitindo que em apenas uma reacção seja amplificado material genético de vários vírus (Syrmis et al. 2004).

Em comparação com as técnicas de detecção convencionais o PCR Multiplex foi demonstrado como a mais sensível e específica, permitindo a detecção de vírus causadores de infecção respiratória em 5-8 horas (Bruijnesteijn van Coppenraet et al. 2010).

Uma das maiores limitações da técnica de PCR é a possibilidade de falsos-negativos pela presença de inibidores nas amostras biológicas, que não são removidos durante o processo de extracção de ácidos nucleicos (Syrmis et al. 2004).

## **2-Objetivos**

## 2. Objectivos

---

O impacto das infecções virais na população pediátrica do Centro Hospitalar do Porto fomentou a possibilidade da utilização de novas tecnologias para a detecção de vírus respiratórios, que de uma forma rápida e sensível fornecesse resultados num período de tempo clinicamente útil.

Assim, o objectivo deste trabalho foi implementar uma metodologia molecular rápida e sensível para detectar vírus respiratórios.

Para tal:

- foram testados três kits comerciais de métodos moleculares para a detecção de vírus respiratórios;
- os resultados dos três métodos moleculares foram comparados entre si e com a técnica utilizada até então na rotina laboratorial, imunofluorescência;
- a técnica com melhores resultados foi implementada na rotina do Laboratório para fazer o diagnóstico laboratorial de infecções respiratórias de etiologia viral.



## **3 - Material e Métodos**

### 3. Material e Métodos

---

#### 3.1. Estudo inicial para selecção da técnica molecular a implementar

##### 3.1. 1. Amostras

Foram estudadas 58 amostras (Lavado nasofaríngeo) no período compreendido entre Julho de 2009 e Junho de 2010, provenientes maioritariamente de crianças com idade inferior a cinco anos, com quadro de doença respiratória.

As amostras foram recebidas na rotina laboratorial do serviço de Microbiologia do CHP-Hospital de Santo António, pelo sector de virologia onde foi efectuada a detecção de antígenos virais e posteriormente foi conservada uma alíquota da amostra a  $-75^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  para posterior estudo molecular.

##### 3.1.2. Métodos de detecção

Os vírus respiratórios foram detectados através de um método de imunofluorescência e por três métodos moleculares.

##### 3.1.2.1. Detecção de antígenos virais

A detecção de antígenos virais foi efectuada no sector de Virologia, em amostras frescas, ou seja, no próprio dia de entrada (salvo fins de semana, em que foram convenientemente conservadas).

##### 3.1.2.1.1. Imunofluorescência Indirecta

A detecção foi efectuada pela técnica de IFI, Biotrin®, segundo as instruções do fabricante. A identificação do vírus específico foi feita através da utilização de anticorpos

monoclonais específicos. As amostras foram fixadas e incubadas com anticorpo monoclonal em lâmina de vidro. Se o antígeno viral específico estiver presente na amostra é formado um complexo estável com o anticorpo. Uma reacção positiva é caracterizada por uma fluorescência verde brilhante, as células não infectadas apresentam-se vermelhas.

Os vírus analisados são: Influenza vírus A, B; Parainfluenza 1/2/3; Vírus Sincicial Respiratório e Adenovírus. O resultado final por esta metodologia é obtido em cerca de 2 horas.

#### **3.1.2.1.2. Imunofluorescência Directa**

A pesquisa de MPV foi realizada por IFD (Metapneumovírus), Diagnostic Hibrids® segundo as instruções do fabricante. O resultado final é obtido em cerca de 2 horas.

#### **3.1.2.2. Detecção por Métodos Moleculares**

##### **3.1.2.2.1. Extracção do Ácido Nucleico**

Na extracção de ácidos nucleicos foi efectuada no equipamento EZ1 Biorobot, Qiagen, usando o Kit Vírus Mini kit 2.0 Qiagen. Foi usado um volume de amostra de 400 µl, com eluição de ácidos nucleicos num volume final de 60 µL. Após extracção os ácidos nucleicos foram conservados a  $-75^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$

##### **3.1.2.2.2. Detecção do Ácido Nucleico**

##### **Detecção com o Kit RV15 ACE Detection, Seegene**

Metodologia de PCR multiplex com detecção do produto amplificado por electroforese em gel de acrilamida. Tem como particularidade a utilização de metodologia DPO (Dual Priming Oligonucleotide) - presença de vários pares de *primers* na reacção, um sistema

funcional e estruturalmente diferente dos *primers* convencionais. No sistema DPO os *primers* são constituídos por dois segmentos distintos com propriedades de *annealing* distintas, o mais comprido 5' - inicia uma ligação estável, e um segmento mais curto 3' - segmento que determina a extensão do alvo específico. São constituídos por dois segmentos separados, um mais longo que o outro, unidos por *polydeoxyinoside*.

O sistema DPO compreende três regiões, um segmento 5' longo, um segmento 3' curto e um poly (I) linker que serve de ponte entre os dois segmentos iniciais.

O *polideoxyinoside* (poly(I)) inserido entre os dois segmentos assume uma estrutura de bolha, separando um simples *primer* em duas regiões funcionais distintas promovendo a eliminação da extensão de ligações não específicas (Chun et al. 2007).

Os vírus detectados por esta técnica são: Influenza vírus A, B; Parainfluenza vírus 1, 2, 3 e 4 (subtipos A e B); Vírus Sincicial Respiratório tipo A (RSV-A); Vírus Sincicial Respiratório tipo B (RSV-B); Rhinovirus (A/B/C), Metapneumovirus (subtipos A e B); Enterovirus; Adenovirus; Coronavirus 229E/NL63 e CoV OC43 e Bocavirus (1/2/3/4).

Como resultado final é obtido uma apreciação numérica, sendo gerada uma banda respectiva à detecção. O resultado final por esta metodologia é obtido em cerca de 5 horas.

A transcrição reversa foi efectuada utilizando o kit fermentas RevertAid™, de acordo as indicações do fabricante no termociclador Biometra T3000, segundo o programa descrito na Tabela 1. Foram utilizados 8µL de RNA/DNA viral de cada amostra, um controlo negativo e um controlo positivo.

**Tabela 1** - Programa de Transcrição Reversa - RV15

Ciclos	Temperatura (°C)	Tempo (s)
1	37	5400
2	94	120

A amplificação de ácidos nucleicos compreendeu a preparação de três misturas de reacção distintas (A, B e C), cada uma destas compostas por *primers* e sondas específicas, para detectar os vírus representados na Tabela 2.

Aos 17 µL de mistura de reacção, foram adicionados 3 µL de cDNA. Em todos os ensaios foram incluídos um controlo positivo e um controlo negativo. O controlo interno está incluído na mistura de reacção.

**Tabela 2** - Vírus detectados nas diferentes misturas de reacção – RV15

<b>Mix A</b>	<b>Mix B</b>	<b>Mix C</b>
Adenovirus	Coronavirus OC43	Bocavirus
Coronavírus 229E/NL63	Rhinovirus A/B/C	Influenza B
Parainfluenza 1	Vírus Sincicial Respiratório A	Metapneumovirus
Parainfluenza 2	Vírus Sincicial Respiratório B	Parainfluenza 4
Parainfluenza 3	Influenza A	Enterovirus

O PCR foi efectuado no termociclador Biometra T3000, com o programa de PCR descrito na Tabela 3.

**Tabela 3** - Programa de Amplificação RV15 ACE

Ciclos	Temperatura (°C)	Tempo (s)
1	94	900
40	94	30
	60	90
	72	90
1	72	600

Após o PCR e antes da detecção, o produto amplificado foi colocado em câmara com luz UV (365 nm) durante 20 minutos para diminuir a possibilidade de ligações inespecíficas.

A detecção do produto amplificado foi efectuada por electroforese em gel de acrilamida, recorrendo ao sistema LAB 901, utilizando Screen tapes®. Cada *Screen tape* contém 8 poços, capazes de correr oito amostras em simultâneo. Para a electroforese, foram utilizados 2µL de produto amplificado.

O sistema informático permitiu visualizar a imagem típica do gel de electroforese, sendo possível comparar os fragmentos obtidos com um marcador de pesos moleculares específico. O software analisou os padrões obtidos, identificando automaticamente os fragmentos e atribuindo-lhes um valor numérico, correspondente à concentração estimada do produto amplificado.

### **Detecção com o Kit: CLART® (Clinical Array Technology) Hibridação com microarrays de baixa densidade**

Microarrays de DNA e RNA tem sido implementados no diagnóstico de patógenos específicos (Murray et al. 2007).

A detecção dos vírus é efectuada através da amplificação RT-PCR (transcriptase reversa seguida de PCR) de um fragmento específico do genoma viral de entre 120-330 pb. A visualização do produto amplificado é realizada através da utilização de tecnologia de “microarrays” de baixa densidade: CLART®(Clinical Array Technology).

O sistema de detecção CLART® *Pneumovir* baseia-se na precipitação de um produto insolúvel naquelas zonas do tubo (com sondas incorporadas) nas quais se produz a hibridização dos produtos amplificados por sondas específicas. Durante a RT-PCR, os produtos amplificados são marcados com biotina. Após a amplificação, ocorre a hibridização com as respectivas sondas específicas que estão imobilizadas em locais conhecidos e concretos do tubo, após o qual são incubadas com conjugado estreptavidina-peroxidase. O conjugado liga-se através da estreptavidina com a biotina presente nos produtos amplificados (que também se encontram ligados às suas sondas específicas) e a actividade da peroxidase provoca o aparecimento de um produto insolúvel na presença do substrato o-dianisidina, com o que se produz a precipitação deste nas zonas do tubo que ocorre a hibridização.

Os vírus analisados são: Influenza vírus A, B e C; Parainfluenza vírus 1, 2, 3 e 4 (subtipos A e B); Vírus Sincial Respiratório tipo A (RSV-A); Vírus Sincial Respiratório tipo B (RSV-B); Rhinovirus, Metapneumovirus (subtipos A e B); Enterovirus (Echovirus); Adenovirus; Coronavírus e Bocavírus.

Como resultado final é obtido uma apreciação quantitativa, em que nos é dado um valor de negativo/positivo, sem qualquer tipo de comparação com bandas ou curvas. O resultado final é obtido em cerca de 8 horas.

Com este kit a RT e PCR são feitos em simultâneo num só passo. O kit é composto por uma mistura enzimática (mistura de RT - transcriptase e DNA polimerase) pronta a usar, e

por dois tubos diferentes que contêm os reagentes necessários para a amplificação de 17 tipos e subtipos de vírus respiratórios. Os dois tubos separadamente contêm reagentes para a amplificação de Coronavírus; Metapneumovírus (subtipos A e B); Parainfluenza 1, 2, 3 e 4 e VSR-A; e reagentes para a amplificação de Adenovírus; Bocavírus; Enterovírus; Influenza A, B e C; Rhinovírus e VSR-B.

A cada um dos tubos referidos foi adicionado 2µL de enzima. O volume de amostra utilizada foi 5µL e 5µL de controlo negativo. Este kit não incluiu controlo positivo, apenas controlo interno.

O PCR foi efectuado no termociclador Applied Biosystems Applied 9700, com o programa de PCR descrito na Tabela 4.

**Tabela 4** - Programa de amplificação CLART® (Clinical Array Technology)

	Ciclos	Temperatura (°C)	Tempo (s)
	1	45	2700
		95	900
45		95	30
		50	90
		68	60
		68	600
1		60	30

A detecção do produto amplificado foi realizada utilizando tiras de *microarrays*, (cada tira continha 8 tubos cada um com um *microarray* na parte inferior), e baseou-se na hibridação do produto amplificado com as respectivas sondas imobilizadas (no *microarray*) e posterior precipitação do produto insolúvel.



A leitura dos resultados foi realizada com um Software específico concebido e validado pela GENOMICA CAR, (Clinical Array Reader). Foi obtida e gravada uma imagem das tiras de *microarray*, emitido de um modo totalmente automatizado, sendo gerado um relatório único para cada amostra analisada.

### **Deteção pelo kit Magicplex™ RV Panel Real-Time Test**

O painel Magicplex RV Real-Time é baseado na propriedade READ™ (Real Amplicon Detection), Seegene™. Esta tecnologia combina as vantagens de um formato multiplex com um sistema de PCR em tempo real, sendo realizados em duas etapas: amplificação da sequência de DNA/RNA dos patógenos alvo, em termociclador convencional e posterior detecção do produto amplificado por PCR em tempo real.

É de referir que os vírus identificados não são discriminados quanto ao seu subtipo (incluindo PIV), assim como também não faz a distinção entre Rhinovirus e Enterovirus.

Os resultados são qualitativos, permitindo através de curvas obtidas avaliar a intensidade destas assim como valores de Ct (*Cycle threshold*)

Os vírus analisados são: Influenza vírus A, B; Parainfluenza 1/2/3/4; Vírus Sincicial Respiratório tipo A/B; Rhinovirus/Enterovirus; Metapneumovirus; Adenovirus; Coronavírus e Bocavirus 1/2/3/4.

Estes testes permitem ter um resultado em cerca de 5 horas.

A transcrição reversa foi efectuada utilizando o kit RevertAid™ Fermentas, no termociclador Biometra T3000 segundo o programa descrito na Tabela 5, de acordo com as indicações do fabricante.

Foram utilizados 11 µL de RNA/DNA viral de cada amostra, de controlo negativo e de controlo positivo.

**Tabela 5** - Programa de Transcrição Reversa – Magicplex

Ciclos	Temperatura (°C)	Tempo (s)
1	37	2700
2	94	120

A amplificação de ácidos nucleicos foi efectuada utilizando 20 µL de cDNA, num volume total de 50 µL, no termociclador Biometra T3000, segundo o programa descrito na Tabela6, de acordo com as indicações do fabricante.

**Tabela 6** - Programa de Amplificação – Magicplex

Ciclos	Temperatura (°C)	Tempo (s)
1	94	900
10	94	30
	60	90
	72	60
	94	30
35	60	30
	72	30
	94	30
1	72	120

Para a detecção do produto amplificado, foram preparadas três misturas de reacção, contendo *primers* e sondas específicos, capazes de detectar 15 agentes, de acordo com a Tabela 7.

**Tabela 7** - Agentes detectados - Magicplex

DOM1	DOM2	DOM3
InFA	MPV	RhV/EV
InFB	AdV	BoV
VSR	CoV	PIV
CI	CI	CI

**CI** – Controlo Interno

Foram utilizados 2 µL de produto amplificado num volume final de 20 µL.

A detecção foi efectuada no termociclador SmartCycler® II com o programa referido na Tabela 8 de acordo com as indicações do fabricante.

**Tabela 8** - Programa de Detecção - Magicplex

Ciclos	Temperatura (°C)	Tempo (s)
1	95	120
	95	20
20	60	40

A interpretação dos resultados foi efectuada visualmente, tendo sido considerado positivo sempre que o valor de fluorescência ultrapassa o Ct – *Cycle threshold* definido pelo fabricante (Tabela 9).

Posteriormente foi utilizado um software que efectua uma análise automática dos resultados (*Seegene Viewer*).

**Tabela 9** – Interpretação da detecção e respectivas fluorescências - Magicplex

	<b>DOM1</b>			<b>DOM2</b>			<b>DOM3</b>		
<b>Canal</b>	<i>FAM</i>	<i>CY3</i>	<i>TexasRed</i>	<i>FAM</i>	<i>CY3</i>	<i>TexasRed</i>	<i>FAM</i>	<i>CY3</i>	<i>TexasRed</i>
<b>Threshold</b>	60	120	60	60	120	60	120	120	60
<b>Agente</b>	INFA	INFB	VSR	MPV	Adeno	CoV	Rhino/EV	BoV	PIV
Controlo Interno detectado no canal <i>CY5</i> – Cycle Threshold – 30									

### **3.2. Estudo com a técnica seleccionada**

#### **3.2.1. Amostras**

Durante o período compreendido entre Fevereiro e Agosto de 2011 foram estudadas 263 amostras de lavado nasofaríngeo provenientes maioritariamente do Internamento e Urgência Pediátrica.

#### **3.2.2. Extracção, amplificação e detecção viral**

Foi utilizado o mesmo método de extracção e transcrição reversa referidos anteriormente no estudo comparativo. Para a amplificação e detecção do produto amplificado foi utilizado o kit Magicplex™ RV Panel Real-Time Test anteriormente detalhadamente descrito.

#### **3.2.3. Análise Estatística**

A recolha de dados foi efectuada através da base de dados do Serviço de Microbiologia/Biologia Molecular do CHC - Hospital de Santo António. Foram previamente definidas e categorizadas as seguintes variáveis: sexo, idade, diagnóstico e vírus detectados.

A análise estatística foi efectuada com o software estatístico SPSS, versão 19.0. Foi usado o teste de Kolmogorov-Smirnov para analisar a distribuição das variáveis, o teste de Kruskal-Wallis para comparar medianas em mais de 2 amostras e o teste do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) para comparar proporções em 2 ou mais amostras.

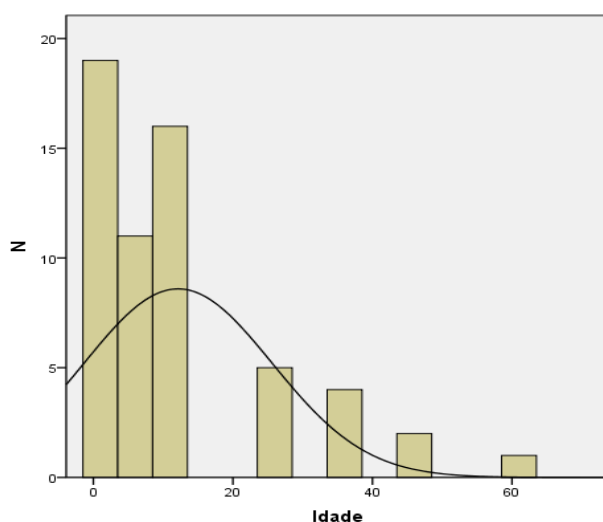
## **4 -Resultados**

## 4. Resultados

### 4.1. Resultados do estudo comparativo

#### 4.1.1. Caracterização da amostra do estudo comparativo

Os 58 doentes estudados tinham idades compreendidas entre os 1 e os 60 meses com média de aproximadamente 12 meses e um desvio padrão de mais ou menos 14 meses ( $M=12,14$ ,  $DP=13,46$ ). O valor mediano obtido foi de 8 meses ( $Md=8$ ) sendo o mais comum os 12 meses. As idades foram distribuídas de modo assimétrico positivo o que revela um maior predomínio de indivíduos mais velhos ( $Simetria/Erro\ de\ simetria=5,74$ ) (Figura 1).



**Figura 1** - Distribuição da população estudada por faixas etárias (meses)

A maioria foi do sexo masculino 74.1 % ( $N=23$ ), sendo os restantes do sexo feminino 25.9% ( $N=15$ ) (Tabela 10).

**Tabela 10** – Distribuição percentual da população por sexo

Sexo	N	%
Feminino	15	25,9
Masculino	43	74,1
<b>Total</b>	<b>58</b>	<b>100,0</b>

Os diagnósticos mais frequentes foram bronquiolite 20.7 % (N=12), infecção respiratória 20.7 % (N=12) e Síndrome Febril 13.8 % (N=9). Um grande número de doenças tal como apneias em estudo, bronquite e tosse convulsa, está representado apenas por 1 doente. (Tabela 11)

**Tabela 11** - Totalidade de diagnósticos clínicos

<b>Doenças Diagnosticadas</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
Apneias	1	1,7
Bronquiolite	12	20,7
Bronquite	1	1,7
Bronquite aguda	2	3,4
Bronquite crónica	1	1,7
CIV+FOP taquipneia	1	1,7
Def. Respiratória	2	3,4
Síndrome Febril	9	13,8
Inf. Respiratória	12	20,7
Insuf. Respiratória	3	5,2
IVAS	2	3,4
IVAS, convulsão	1	1,7
Obstrução nasal	1	1,7
Pneumonia	3	5,2
Tosse convulsa	2	3,4
Refluxo vesico-uretral	1	1,7
SDR grave, ventilação mecânica	1	1,7
SIC	1	1,7
Tosse, SDR	1	1,7



#### 4.1.2 Resultados da técnica de IFI

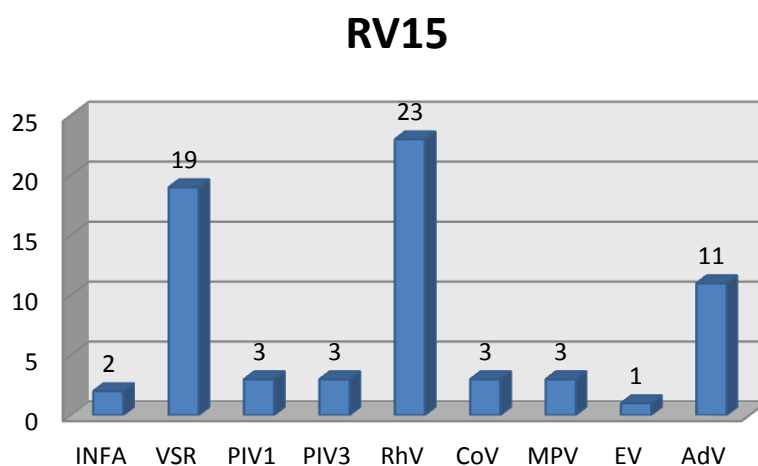
Das 58 amostras estudadas pela técnica de IFI, 15 amostras foram positivas, tendo sido identificados os vírus: VSR (N=12), PIV3 (N=2) e PIV1 (N=1). Por esta técnica não foi identificada nenhuma detecção com mais de um vírus em simultâneo.

#### 4.1.3. Resultados dos métodos moleculares

Os resultados das três metodologias foram avaliados quanto ao número total de detecções, tipo e frequência de detecções das mesmas. A frequência e tipo de associações com outros vírus também foram avaliados.

##### 4.1.3.1 Kit RV15

No caso do Kit RV15 49 amostras foram positivas para a detecção de vírus respiratórios, e 9 amostras foram negativas. Num total de 68 detecções de vírus positivos, o vírus mais comumente detectado foi, o RhV (N=23, 34 %) seguidamente VSR (N=19, 28 %) e o AdV (N=11, 16 %). (Figura 2)

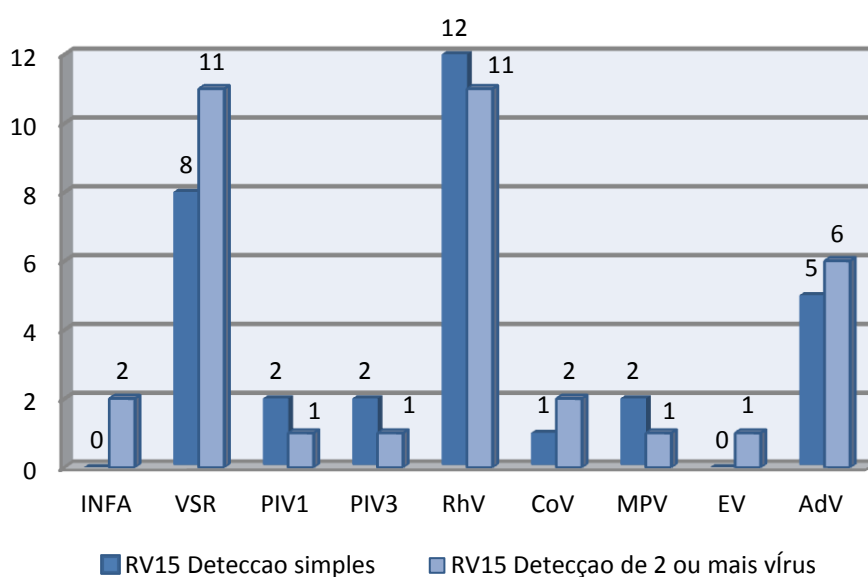


**Figura 2** - Totalidade de vírus detectados pelo Kit RV15

Da totalidade das 32 detecções simples, os vírus mais frequentemente detectados foram o RhV (N=12, 38 %), o VSR (N=8, 25 %) e o AdV (N=5, 16 %) (Figura 3).

Nas detecções com mais de um vírus, foram identificadas 17 co-deteccões (14 detecções duplas e 3 detecções com mais de dois vírus).

Nas detecções duplas, a combinação mais frequente foi a associação VSR/RhV (N=6, 43%).

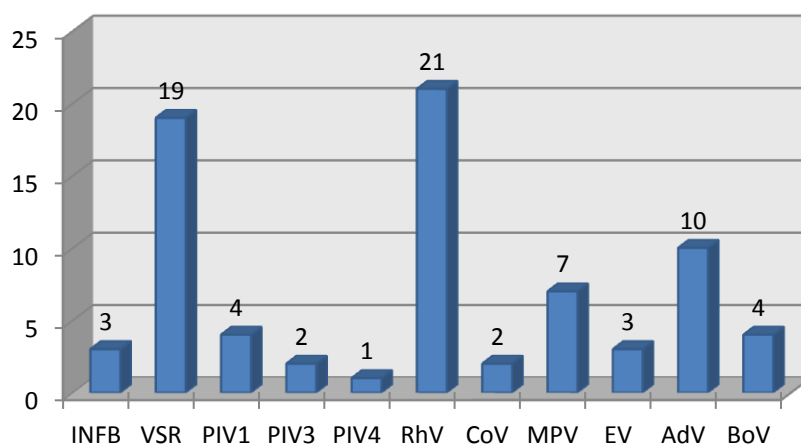


**Figura 3** - Vírus detectados pelo kit RV15 isoladamente e em associação

#### 4.1.3.2. Kit Pneumovir

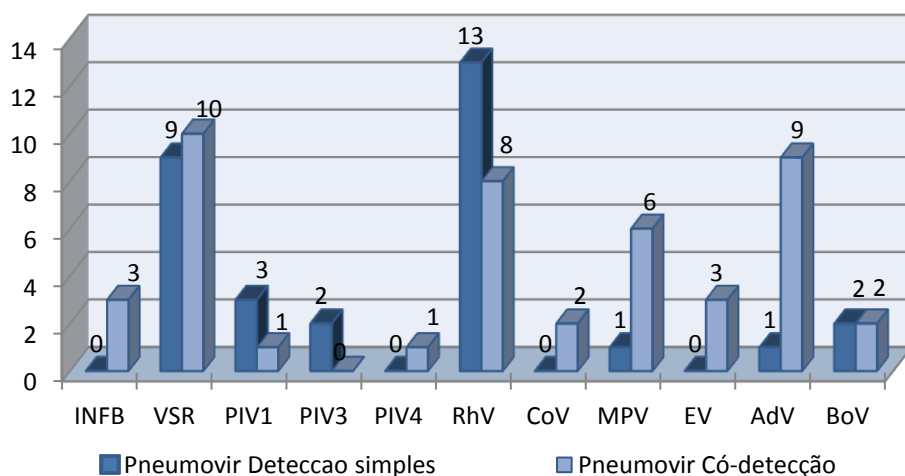
Utilizando o kit Pneumovir foram detectados vírus respiratórios em 50 amostras, em 8 amostras não foi detectado nenhum vírus. Com uma totalidade de 76 detecções, os vírus detectados com mais frequência foram RhV (N=21, 28 %), VSR (N=19, 25 %) e o AdV (N=10, 13 %) (Figura 4).

## Pneumovir



**Figura 4** - Vírus respiratórios detectados pelo kit Pneumovir

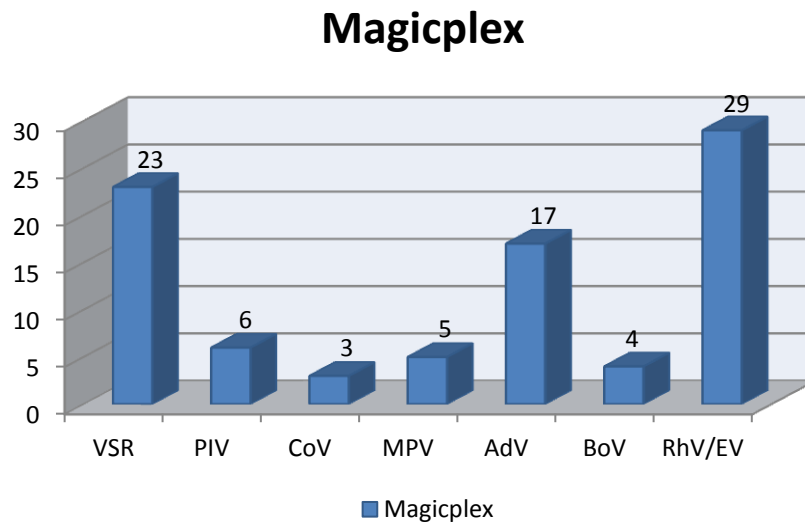
Das 31 detecções simples, o vírus mais frequentemente detectado foi o RhV (N=13, 42 %), seguindo-se o VSR (N=9, 29 %) (Figura 5). No total foram identificadas 19 tipos de associações com outros vírus (13 detecções duplas e 6 detecções com mais de dois vírus). A associação dupla mais frequente foi a associação AdV/RhV (N=5, 38 %).



**Figura 5** – Vírus respiratórios detectados isoladamente e em associação pelo kit Pneumovir

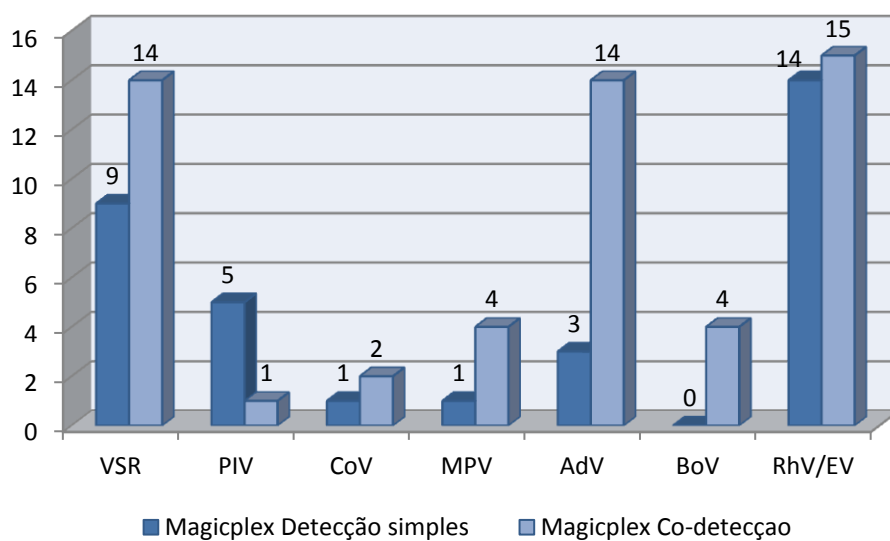
#### 4.1.3.3. Kit Magicplex

Utilizando o kit Magicplex foram observadas 54 amostras positivas para a detecção de vírus respiratórios, em 4 amostras não foi detectado nenhum vírus. Num total de 87 detecções de vírus positivos (Figura 6), o vírus mais comumente detectado foi, o RhV/EV (N=29, 33 %), seguindo-se o VSR (N=23, 26 %) e AdV (N=17,19 %).



**Figura 6** - Vírus respiratórios detectados pelo kit Magicplex

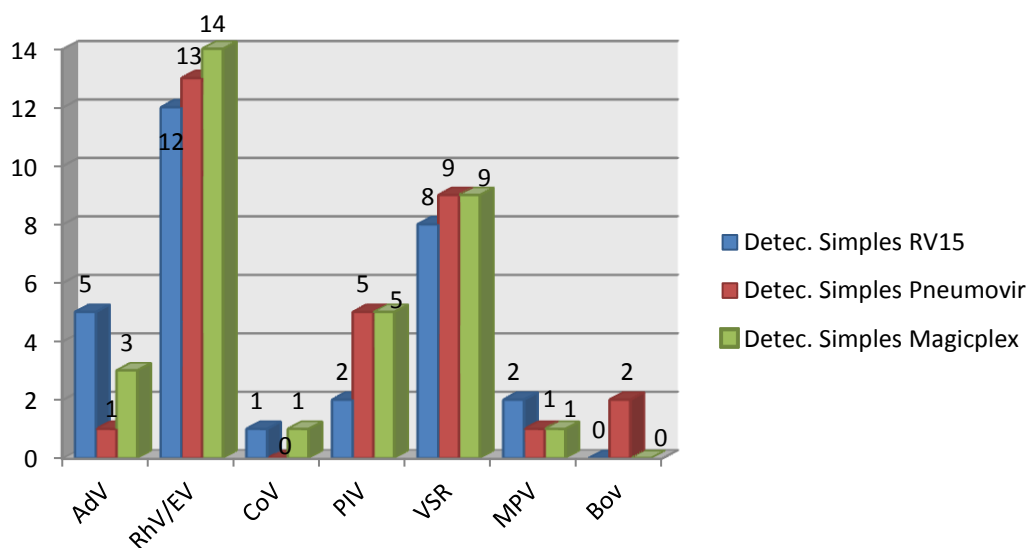
Do conjunto de 33 detecções simples, o vírus mais frequentemente detectado foi o RhV (N=14, 42 %), seguindo-se o VSR (N=9, 27 %) e PIV (N=5, 15) (Figura 7). No total foram identificadas 21 tipos de associações com outros vírus (12 detecções duplas e 9 detecções com mais de dois vírus). A associação dupla mais frequente foi a associação AdV/RhV (N=4, 33%), e VSR/RhV (N=3, 25 %).



**Figura 7** - Vírus respiratórios detectados isoladamente e em associação pelo kit Magicplex

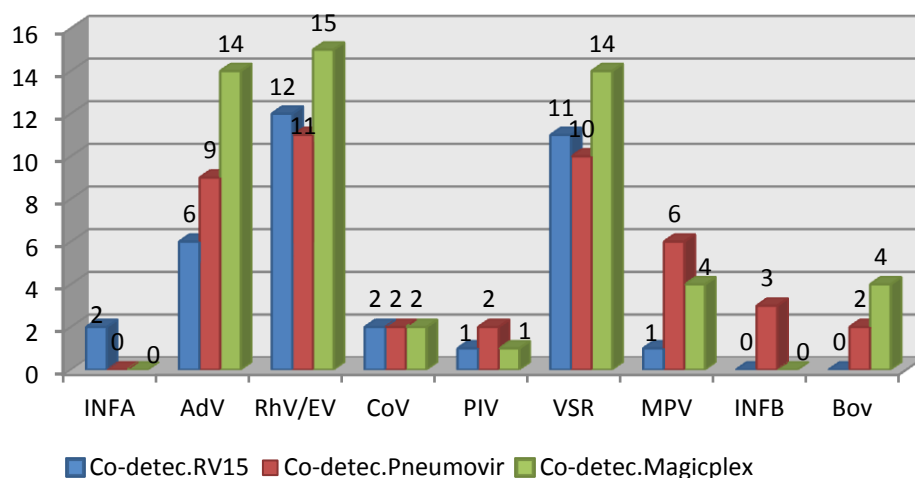
#### 4.1.4. Comparação dos resultados obtidos pelos três kits

Na Figura 8 são apresentadas as detecções simples detectadas pelos três kits comerciais estudados.



**Figura 8** - Detecções simples identificadas pelos três kits

Na Figura 9 estão demonstrados as detecções com mais de um vírus para os três kits estudados.



**Figura 9** - Co-deteções identificadas pelos três kits

Dos resultados obtidos individualmente em cada kit, apenas 27 foram iguais para os três kits, tendo sido necessário estabelecer parâmetros de concordância e comparação entre as três técnicas. Para tal, um vírus detectado em pelo menos duas das três técnicas foi considerado como verdadeiro positivo (resultado concordante). Num total de 72 detecções de vírus respiratórios positivos, o vírus mais comumente detectado foi o RhV 36 % (N=26) seguidamente o VSR 28 % (N=20) e o AdV 17 % (N=12) (Tabela 12).

**Tabela 12** – Resultados concordantes para os três kits comerciais estudados

Resultados concordantes para os kits				N	%
Negativos				5	9
Positivos				53	91
Total vírus detectados				72	
	Detecção Simples			37	
		RhV		14	37,8
		VSR		12	32,4
		PIV		6	16,2
		AdV		3	8,1
		MPV		1	2,7
		CoB		1	2,7
		BoV		1	2,7
	Detecção Dupla			13	
		RhV/AdV		5	38,4
		VSR/RhV		3	23
		AdV/VSR		1	7,6
		VSR/MPV		1	7,6
		BoV/RhV		1	7,6
		BoV/AdV		1	7,6
		BoV/MPV		1	7,6
	Detecção Tripla			3	
		AdV/VSR/RhV		2	66,6
		CoV/RhV/VSR		1	33,3

Os valores de sensibilidade/especificidade/VPP/VPN (Tabela 13) foram determinados para cada técnica relativamente aos valores concordantes (Tabela 12).

**Tabela 13** – Valores de sensibilidade, especificidade, VPP e VPN das técnicas estudadas

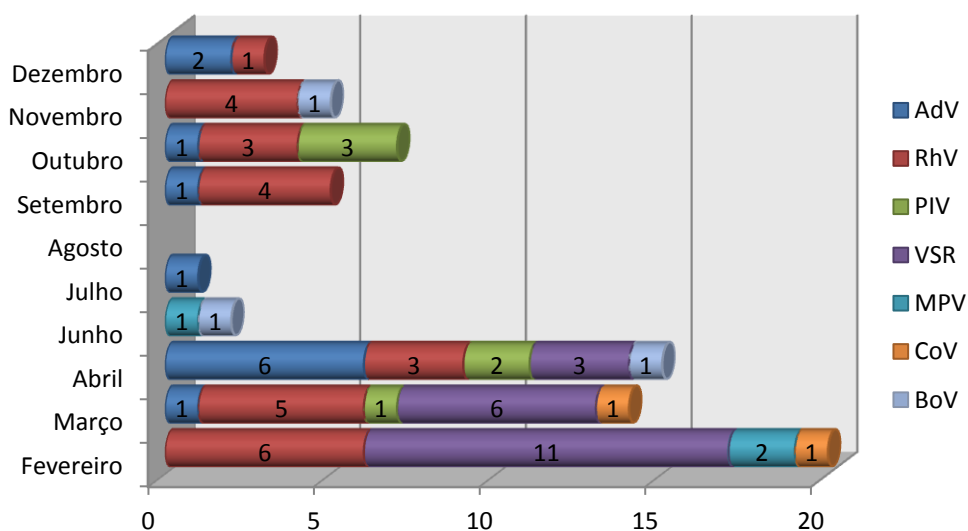
	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN
<b>IFI</b>	38 %	95 %	93 %	<b>95 %</b>
<b>RV15</b>	78 %	42 %	81 %	<b>42 %</b>
<b>Pneumovir</b>	88 %	33 %	79 %	<b>33 %</b>
<b>Magicplex</b>	100 %	33 %	85 %	<b>33 %</b>

$$\text{Sensibilidade} = [a/(a+c)] \quad \text{Especificidade} = [d/(b+d)]$$

$$\text{VPP (valor preditivo positivo)} = [a/(a+b)] \quad \text{VPN (valor preditivo negativo)} = [d/(c+d)]$$

#### 4.1.5 Variação dos vírus detectados ao longo do período do estudo

O número de amostras analisadas ao longo do período do estudo variou o que dificulta a avaliação da variação sazonal. No entanto, observou-se que o RhV foi o vírus mais detectado entre Outubro e Abril (Figura 10), sendo o VSR também frequentemente detectado no Inverno e no início da Primavera. No mês de Agosto não foram detectados vírus respiratórios.



**Figura 10** - Vírus detectados nos diferentes meses do ano



#### 4.1.6 Relação entre diagnóstico clínico e vírus detectados

Dos três diagnósticos mais frequentes destacam-se: bronquiolite (N=12), infecção respiratória (N=12) e febre (N=9). A associação dos diagnósticos mais frequentes e dos vírus mais frequentemente detectados estão referidos na Figura 11. É de evidenciar que o vírus mais frequentemente associado à bronquiolite foi o VSR.

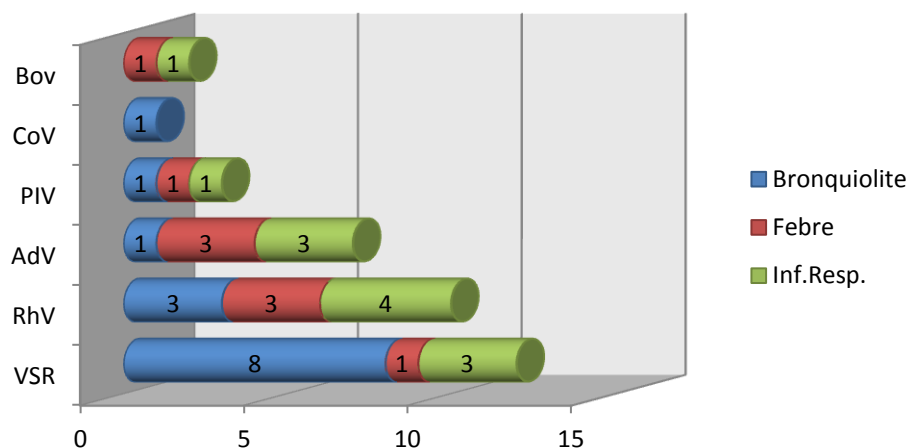


Figura 11 - Vírus presentes nas amostras dos diferentes quadros clínicos

#### 4.2. Resultados da técnica Implementada

Em Fevereiro de 2011 após testar os três kits moleculares, foi implementado no CHP o kit Multiplex - Magicplex™ RV Panel Real-Time na rotina laboratorial para a detecção de vírus respiratórios. A população estudada com este kit foi maioritariamente constituída por crianças 97 % (N=255), e 3% (N=8) adultos. Consequentemente foram estudadas apenas as amostras pediátricas (N=255), visto a percentagem de adultos não ser clinicamente significativa.

Das 255 amostras, 122 (47,8 %) eram do sexo feminino e 133 (52,2 %) do sexo masculino.

#### 4.2.1. Distribuição por faixa etária

Os 255 doentes estudados tinham idades compreendidas entre os 1 mês e os 18 anos com média de aproximadamente 2.85 anos e um desvio padrão de mais ou menos 4.2 anos (Figura12).

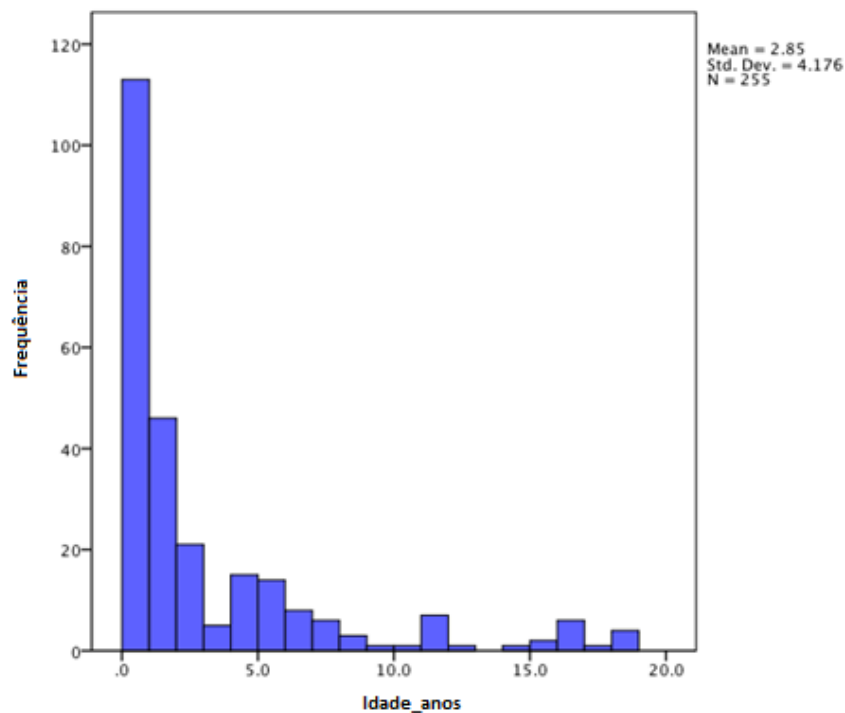


Figura 12 - Distribuição das idades (anos)

#### 4.2.2. Diagnósticos correspondentes às amostras estudadas

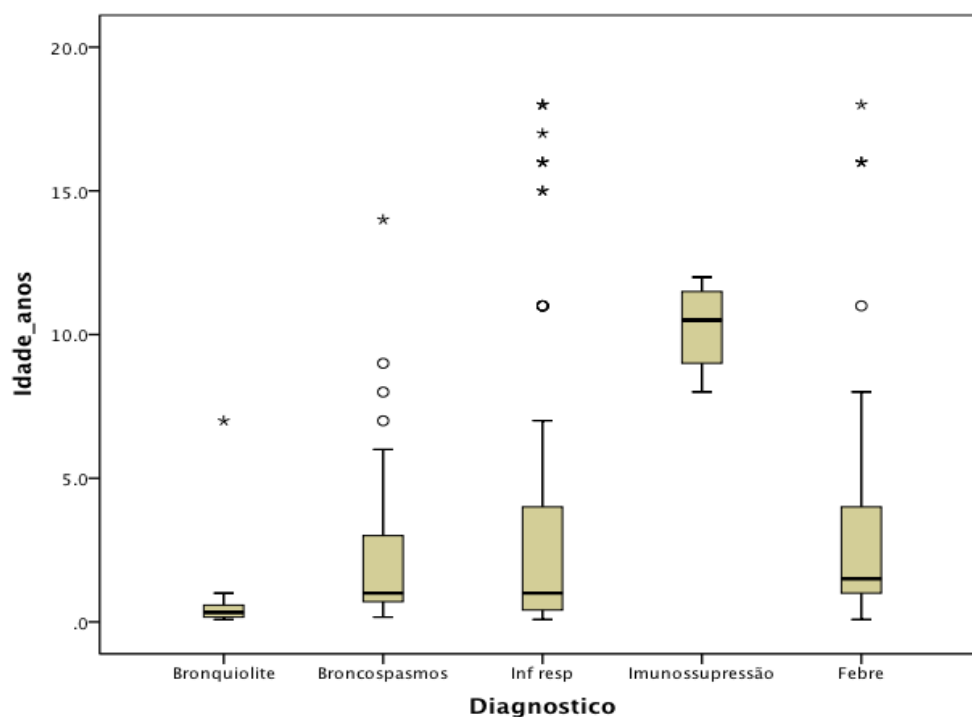
A informação fornecida pelo clínico sobre os diagnósticos acompanharam as amostras, desta forma foi possível estabelecer uma relação de frequências entre as diferentes informações clínicas (Tabela 14). Pela análise dos resultados obtidos verifica-se de facto, uma maior frequência de infecção respiratória e bronquiolite, com percentagens de 55.3% e 17.6 % respectivamente.

**Tabela 14-** Distribuição da população segundo o diagnóstico clínico

Diagnóstico	Frequência	Porcentagem
Infecção Respiratória	<b>141</b>	<b>55.3 %</b>
Bronquiolite	<b>45</b>	<b>17.6 %</b>
Síndrome Febril	<b>38</b>	<b>14.9 %</b>
Broncoespasmo	<b>27</b>	<b>10.6 %</b>
Imunossupressão	<b>1.6</b>	<b>2 %</b>
Total	<b>255</b>	<b>100 %</b>

#### 4.2.3. Relação entre os diagnósticos e idade

Na Figura 13 está descrita a relação entre os diagnósticos e as idades (em anos).



**Figura 13-** Distribuição das idades (anos) e diagnósticos

Dos diagnósticos mais frequentes destacam-se a infecção respiratória com média de 3 anos, desvio padrão de 4,3 anos (mediana=1,0); broncoespasmo com média de 2,6 anos e

desvio padrão de 3,4 anos (mediana=1,0); bronquiolite com média de 0,5 anos e um desvio padrão de 1,0 ano (mediana=0,33).

#### 4.2.4. Frequências dos vírus pesquisados

Para o total de resultados de exames virológicos positivos (N=208), verificou-se que o vírus mais frequente na população em estudo foi o AdV (N= 117) com uma percentagem de 56.3 %, seguido do RhV/EV com 35.0 % e VSR com 33.2 % (Tabela 15). As frequências dos vírus INFA, CoV e INFB são consideravelmente mais baixas.

**Tabela 15** - Distribuição dos vírus detectados

<b>Vírus Detectado</b>	<b>Frequência</b>	<b>Percentagem %</b>
<b>AdV</b>	<b>117</b>	<b>56.3</b>
<b>RhV/EV</b>	<b>73</b>	<b>35.0</b>
<b>VSR</b>	<b>69</b>	<b>33.2</b>
<b>PIV</b>	<b>36</b>	<b>17.3</b>
<b>MPV</b>	<b>35</b>	<b>18.8</b>
<b>BoV</b>	<b>19</b>	<b>9.1</b>
<b>INFA</b>	<b>12</b>	<b>5.7</b>
<b>CoV</b>	<b>10</b>	<b>4.8</b>
<b>INFB</b>	<b>5</b>	<b>2.4</b>
<b>Total</b>	<b>208</b>	<b>100%</b>

#### 4.2.5. Tipos de associações

Foram observadas 103 detecções com apenas um vírus, sendo o AdV o mais detectado (Tabela 16). Das noventa detecções duplas a associação mais frequente foi AdV/VSR (N=20); foram detectadas 32 detecções com mais de dois vírus sendo a associação mais frequente AdV/PIV/VSR 13 (N=4). O vírus mais detectado em associação com outro (s) vírus foi o AdV (N=84).

**Tabela 16** - Vírus detectados e tipos de associação

Resultados				N	%
Negativos				47	18,4
Positivos				208	81,5
	Detecção Simples			103	40,3
	Detecção Dupla			90	35,3
	Detecção com mais de dois vírus			32	12,5

#### 4.2.6. Relação entre diagnóstico e vírus detectados

O vírus mais comumente associado aos diagnósticos apresentados foi o AdV. Apenas para o diagnóstico broncospasmo é que o RhV/EV foi o mais frequente (Tabela 17).

Não foi tido em conta o diagnóstico de imunossupressão por ser estatisticamente pouco significativo.

**Tabela 17** - Associação entre o diagnóstico clínico e vírus detectado

Diagnóstico	Detecção Viral																	
	AdV		RhV/EV		VSR		MPV		PIV		BoV		INFA		CoV		INFB	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
<b>Infecção Respiratória</b>	<b>64</b>	45.4	43	30.5	29	20.6	18	12.8	17	12.1	11	7.8	8	5.7	5	3.5	2	1.4
<b>Bronquiolite</b>	<b>26</b>	57.8	8	17.8	21	46.7	11	24.4	6	13.3	4	8.9	3	6.7	1	2.2	1	2.2
<b>Síndrome Febril</b>	<b>16</b>	42.1	9	23.7	9	23.7	3	7.9	7	18.4	1	2.6	1	2.6	4		1	2.6
<b>Broncospasmo</b>	11	40.7	<b>12</b>	44.4	10	37.0	3	11.1	4	14.8	3	11.1	0		0		0	

Testaram-se as hipóteses nulas consideradas na Tabela 18 para a independência das variáveis, pelo teste estatístico do Qui-quadrado.

**Tabela 18** - Hipóteses nulas consideradas

Hipótese nula considerada	
H <sub>01</sub> *	Sexo / Diagnóstico
H <sub>02</sub> *	Diagnóstico / idade
H <sub>03</sub> **	Vírus detectado / Diagnóstico

\*Na hipótese H<sub>01</sub> a variável “Diagnóstico” foi categorizada para as informações clínicas: infecção respiratória, bronquiolite, broncospasmo, imunossuprimidos e febre.

\*\*Na hipótese H<sub>02</sub> a variável “Diagnóstico” foi categorizada para as informações clínicas: infecção respiratória, bronquiolite, broncospasmo e síndrome febril; a variável “idade” foi categorizada em anos.

\*\*\*Na hipótese H<sub>03</sub> a variável “Vírus detectado” foi categorizada para os vírus: AdV, RhV/EV, VRS, MPV, PIV, BoV, INFA, CoV e INFB; a variável “diagnóstico” foi categorizada para as informações clínicas: infecção respiratória e bronquiolite.

Na Tabela 19 estão representados os resultados das hipóteses formuladas.

**Tabela 19** - Resultados do teste de Qui-quadrado para a análise das hipóteses nulas

Hipótese nula considerada	Valor de $\chi^2$	Df	Valor de p
H <sub>01</sub>	4,577	4	0,334
H <sub>02</sub>	43,591	3	0,000
H <sub>03</sub> *	11,822	1	0,001

Da análise dos resultados apresentados na Tabela 19 para a H<sub>01</sub> obteve-se um valor de p > 0.05 (p=0,337), que mostra que os diagnósticos não estão significativamente associados ao sexo.

Relativamente ao resultado obtido para a H<sub>02</sub>, verificou-se que há diferenças significativas relativamente à idade (P <0.001), ou seja, o grupo dos doentes com bronquiolite apresenta uma mediana de idades significativamente mais baixa: 4 meses, vs 12 meses no broncospasmo e infecção respiratória e 18 meses na síndrome febril.

O valor referido em H<sub>03</sub>\* mostra que existe uma associação entre o vírus VSR e os diagnósticos de bronquiolite e infecção respiratória p<0.05 (p=0,001). Para os mesmos diagnósticos não houve evidências de significância para os outros vírus comparados (p>0.05).

## **5 -Discussão**



### 5.1. Resultados referentes às metodologias moleculares estudadas

Na primeira parte deste trabalho foram comparados, entre si e com a IFI, os resultados da detecção de vírus respiratórios realizados através de três técnicas de biologia molecular. As três técnicas estudadas foram RV15 ACE Detection, Seegene, CLART® (Clinical Array Technology) Hibridação com *microarrays* de baixa densidade e Magicplex™ RV Panel Real-Time.

Para os vírus detectados simultaneamente por IFI e por técnicas moleculares, a sensibilidade obtida por IFI foi de 38 % e por PCR foi de 93 %.

Na comparação das três técnicas moleculares apenas 27 das 58 amostras estudadas foram totalmente concordantes nos resultados obtidos, pelo que foi necessário estabelecer parâmetros de concordância e comparação entre as técnicas. Para tal um vírus detectado pelo menos em duas das três técnicas foi considerado como verdadeiro positivo. Os resultados indicam um elevado número de resultados que consideramos como falsos positivos, reflexo da falta de comparação dos resultados obtidos com um método de referência como a cultura celular. As sensibilidades e especificidades foram calculadas a partir dos resultados consenso entre as três técnicas, o que explica a quantidade significativa de possíveis falsos positivos. Os resultados deste estudo permitiram concluir que as três técnicas moleculares são mais sensíveis que a técnica de IFI utilizada na rotina laboratorial, sendo as respectivas sensibilidades: IFI 38 %; RV15 78%; Pneumovir 88 % e Magicplex 100 %. Das três técnicas a que apresentou melhores resultados de sensibilidade foi o kit Magicplex™.

Os vírus mais frequentemente detectados pelas três técnicas foram o RhV (RV15 N=23, 34 %; Pneumovir N=21, 28 %; Magicplex N=29, 33 %) seguido de VSR (RV15 N=19, 28 %; Pneumovir N=19, 25 %; Magicplex N=23, 26 %). Contudo, o VSR foi o mais detectado pela técnica de IFI. Apesar de se terem verificado alguns resultados discrepantes, observou-se

uma concordância relativamente aos vírus mais comumente detectado pelas três técnicas moleculares.

Para a técnica de IFI não foi identificada nenhuma detecção dupla, mas as três técnicas moleculares mostraram que a co-deteção com dois ou mais vírus é frequente. Nas três técnicas foram identificadas co-deteções (RV15 N=17; Pneumovir N=19; Magicplex N=21) sendo a detecção dupla mais frequente a associação AdV/RhV (Pneumovir N=5, 38 %; Magicplex N=4, 33 %) e VSR/RhV (RV15 N= 6, 43 %).

A detecção de múltiplos vírus levanta algumas questões sobre a patogenicidade dos diferentes vírus, nomeadamente se todos os vírus detectados são responsáveis pelos diferentes sinais e sintomas de doença apresentados pelo doente (Frobert et al. 2011).

Neste estudo observaram-se resultados concordantes com as três técnicas para doze detecções com dois vírus e quatro detecções com três vírus simultaneamente. Os dados sugerem que não é apenas uma questão de sensibilidade, até porque como demonstrado anteriormente as sensibilidades variam consoante as técnicas. De facto os vírus estavam presentes no organismo numa concentração suficiente para ser detectados.

Apesar de haver algumas limitações quanto à distinção entre co-deteção/co-infecção, alguns estudos demonstraram que em crianças com idade inferior a 2 anos, as infecções múltiplas variam entre 17 % a 30 % (Sigalov 2010). No estudo comparativo foi obtido um falso negativo para duas das técnicas moleculares em comparação com a imunofluorescência. O vírus VSR foi detectado por IFI e pelo kit RV15, não tendo sido detectado com os kits Pneumovir e Magicplex. Esta análise, no entanto, não foi repetida por falta de amostra. Este resultado discrepante pode estar relacionado com o tempo decorrido entre a chegada da amostra e a detecção viral. A técnica de IFI foi efectuada numa amostra fresca de lavado nasofaríngeo, mas a detecção por métodos moleculares foi efectuada em amostras armazenadas a - 80 °C durante algumas semanas ou mesmo meses. Alguns estudos indicam que o armazenamento de amostras a processar por PCR, pode ser responsável por resultados falsos-negativos. O VSR é um vírus de RNA e, como tal, o seu ácido nucleico pode ter sofrido degradação durante o armazenamento

das amostras. É bem conhecido na literatura que o RNA é menos estável que o DNA e como tal mais degradado durante o armazenamento (Roh et al. 2008).

O número de amostras estudadas foi reduzido, não havendo uma real evidência da sazonalidade da detecção viral, contudo, observou-se tal como descrito na literatura que o RhV foi o vírus mais detectado entre Outubro e Abril, sendo o VSR detectado no Inverno e no início da Primavera (Maffey 2008) (Yilmaz et al. 1999).

O diagnóstico mais frequente no estudo foi bronquiolite (N=12), tendo este sido frequentemente associado à detecção viral do VSR.

Neste estudo houve algumas limitações, como a impossibilidade de comparação dos resultados obtidos com a técnica de referência (cultura celular). Esta técnica poderia ter fornecido alguma informação em casos de discrepâncias encontradas, permitindo um conhecimento do estado viável/não viável dos vírus. Uma limitação intrínseca da PCR é a incapacidade de discriminação entre um vírus replicativo ou não, tendo esta limitação de ser considerada na interpretação dos resultados (Roh et al. 2008).

A alta sensibilidade da PCR pode, no entanto, ser considerada uma limitação da técnica. Alguns estudos demonstraram casos de crianças assintomáticas com teste positivo para a detecção de vírus respiratórios, demonstrando que pode ocorrer detecção viral até 5 semanas após uma infecção aguda. Assim, a importância de alguns vírus pode ser sobrestimada nas infecções respiratórias (Sadeghi et al. 2011).

## **5.2. Discussão dos resultados obtidos na Implementação da técnica**

Os resultados obtidos após implementação da metodologia molecular na rotina laboratorial, retratam uma realidade mais alargada da população que a estudada anteriormente na primeira fase do trabalho. Nesta fase não foi possível fazer, contudo, a comparação dos resultados com a técnica de IFI.

Os 255 doentes pediátricos estudados tinham idades compreendidas entre 1 mês e 18 anos com média de aproximadamente 2.85 anos e um desvio padrão de mais ou menos 4.2 anos, o que de facto está de acordo com o descrito anteriormente na revisão bibliográfica, sobre a maior frequência de detecção de vírus respiratórios em crianças com idades inferior a 5 anos (Esper et al. 2003).

Das 255 amostras estudadas 47.8 % (N=122) foram do sexo feminino e 52.2 % (N=133) do sexo masculino. Foram positivas 208 amostras e 47 amostras negativas para a detecção de vírus respiratórios. O vírus mais comumente detectado foi o AdV (N=117, 56.3 %) seguindo-se o RhV (N=73, 35 %), e VSR (N=69, 33.2 %). Estes resultados estão de acordo com o descrito sobre os vírus respiratórios mais comumente detectados em crianças nesta faixa etária (Halfhide and Smyth 2008) (Lehtinen et al. 2007).

Foram detectadas 122 co-deteções, sendo 90 deteções duplas e 32 deteções com mais de dois vírus; a deteção dupla mais frequente foi a associação AdV/VSR (N=20), não sendo esta associação particularmente referida na bibliografia.

Dos diagnósticos mais frequentes associados à presença de vírus respiratórios destacam-se a infecção respiratória, broncospasmo e bronquiolite. Estes resultados estão de acordo com a literatura, nomeadamente em relação à bronquiolite que é frequentemente associada a crianças com idade inferior a 2 anos (Kesson 2007).

Os resultados mostram que os diagnósticos não estão significativamente associados ao sexo ( $p > 0.05$ ). Na literatura também não foi descrito que determinado diagnóstico esteja mais associado a um dos sexos em detrimento do outro.

Contrariamente, verificou-se correlação entre o diagnóstico e a idade ( $p < 0.001$ ), observando-se que diferentes patologias estão frequentemente associadas a determinada faixa etária, como é o caso da bronquiolite (Kesson 2007).

Observou-se correlação entre a presença de VSR e os diagnósticos bronquiolite e infecção respiratória ( $p=0.001$ ), tal associação tem sido descrita na literatura (Semple et al. 2005). Para os mesmos diagnósticos não houve associação com os outros vírus ( $p > 0.05$ ).

A implementação desta técnica na rotina laboratorial levantou uma série de novas questões ainda por responder. A principal questão refere-se à detecção simultânea de múltiplos vírus e à sua importância e significado clínico.

A implementação de técnicas de PCR em tempo real (quantificação da carga viral) pode revelar a verdadeira importância da co-detecção e favorecer assim o tratamento precoce adequado, assim como a monitorização de alteração de níveis de carga viral durante o tratamento (Kuypers et al. 2009).

## **6 – Considerações finais**

## 6. Considerações finais

---

O desenvolvimento e adopção de testes moleculares para a detecção de vírus respiratórios poderão oferecer ao laboratório a capacidade de detectar uma gama ampla de infecções virais, diminuindo custos, recursos e tempo. Estes dados poderão contribuir ainda para o entendimento da epidemiologia viral, proporcionando novas informações sobre sazonalidade, distribuição geográfica e grupos de risco.

A confirmação etiológica das infecções virais permitirá evitar tratamentos dispendiosos e desnecessários. A detecção simultânea de vários vírus e a alta sensibilidade destas técnicas, comparada com a técnica de imunofluorescência, é sem dúvida uma mais-valia no diagnóstico laboratorial.

É ainda difícil avaliar o verdadeiro significado clínico das co-deteções, saber qual dos vírus causa realmente desordem clínica e se a associação entre vírus pode provocar maior severidade da doença.

Um longo caminho de aprendizagem e melhoramento está ainda em aberto, este trabalho levantou uma série de novas questões, que só poderão ser respondidas com mais estudos complementares.

## **7 - Bibliografia**



## 7. Bibliografia

---

- (2011). "Clusters of acute respiratory illness associated with human enterovirus 68 --- Asia, Europe, and United States, 2008--2010." MMWR Morb Mortal Wkly Rep **60**: 1301-1304.
- Abd-Jamil, J., B. T. Teoh, et al. (2010). "Molecular identification of adenovirus causing respiratory tract infection in pediatric patients at the University of Malaya Medical Center." BMC Pediatr **10**: 46.
- Andreoletti, L., F. Renois, et al. (2009). "[Human enteroviruses and respiratory infections]." Med Sci (Paris) **25**(11): 921-930.
- Arden, K. E. and I. M. Mackay (2010). "Newly identified human rhinoviruses: molecular methods heat up the cold viruses." Rev Med Virol **20**(3): 156-176.
- Balada-Llasat, J. M., H. LaRue, et al. (2011). "Evaluation of commercial ResPlex II v2.0, MultiCode-PLx, and xTAG respiratory viral panels for the diagnosis of respiratory viral infections in adults." J Clin Virol **50**(1): 42-45.
- Baron, S., M. Fons, et al. (1996). "Viral Pathogenesis."
- Bartlett, E. J., A. M. Cruz, et al. (2010). "A novel human parainfluenza virus type 1 (HPIV1) with separated P and C genes is useful for generating C gene mutants for evaluation as live-attenuated virus vaccine candidates." Vaccine **28**(3): 767-779.
- Beck, E. T. and K. J. Henrickson (2010). "Molecular diagnosis of respiratory viruses." Future Microbiol **5**(6): 901-916.
- Bruijnesteijn van Coppenraet, L. E., C. M. Swanink, et al. (2010). "Comparison of two commercial molecular assays for simultaneous detection of respiratory viruses in clinical samples using two automatic electrophoresis detection systems." J Virol Methods **169**(1): 188-192.
- Carroll, W. and W. Lenney (2007). "Drug therapy in the management of acute asthma." Arch Dis Child Educ Pract Ed **92**(3): ep82-86.
- Carter, N. J. and M. P. Curran (2011). "Live attenuated influenza vaccine (FluMist(R); Fluenz): a review of its use in the prevention of seasonal influenza in children and adults." Drugs **71**(12): 1591-1622.
- Catalano-Pons, C., C. Vallet, et al. (2009). "[Human bocavirus infections]." Med Mal Infect **39**(6): 353-355.
- Cheng, V. C., S. K. Lau, et al. (2007). "Severe acute respiratory syndrome coronavirus as an agent of emerging and reemerging infection." Clin Microbiol Rev **20**(4): 660-694.
- Cho, H. Y., F. Imani, et al. (2009). "Antiviral activity of Nrf2 in a murine model of respiratory syncytial virus disease." Am J Respir Crit Care Med **179**(2): 138-150.
- Choi, E. H., H. J. Lee, et al. (2006). "The association of newly identified respiratory viruses with lower respiratory tract infections in Korean children, 2000-2005." Clin Infect Dis **43**(5): 585-592.
- Chun, J. Y., K. J. Kim, et al. (2007). "Dual priming oligonucleotide system for the multiplex detection of respiratory viruses and SNP genotyping of CYP2C19 gene." Nucleic Acids Res **35**(6): e40.
- Coiras, M. T., J. C. Aguilar, et al. (2004). "Simultaneous detection of fourteen respiratory viruses in clinical specimens by two multiplex reverse transcription nested-PCR assays." J Med Virol **72**(3): 484-495.
- Damen, M., R. Minnaar, et al. (2008). "Real-time PCR with an internal control for detection of all known human adenovirus serotypes." J Clin Microbiol **46**(12): 3997-4003.
- Dey, R. S., S. Ghosh, et al. (2011). "Circulation of a novel pattern of infections by enteric adenovirus serotype 41 among children below 5 years of age in Kolkata, India." J Clin Microbiol **49**(2): 500-505.

- Dijkman, R., S. M. Koekkoek, et al. (2009). "Human bocavirus can be cultured in differentiated human airway epithelial cells." *J Virol* **83**(15): 7739-7748.
- Dijkman, R. and L. van der Hoek (2009). "Human coronaviruses 229E and NL63: close yet still so far." *J Formos Med Assoc* **108**(4): 270-279.
- Esper, F., D. Boucher, et al. (2003). "Human metapneumovirus infection in the United States: clinical manifestations associated with a newly emerging respiratory infection in children." *Pediatrics* **111**(6 Pt 1): 1407-1410.
- Espy, M. J., J. R. Uhl, et al. (2006). "Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing." *Clin Microbiol Rev* **19**(1): 165-256.
- Fiore, A. E., C. B. Bridges, et al. (2009). "Seasonal influenza vaccines." *Curr Top Microbiol Immunol* **333**: 43-82.
- Forbes, B., D. Sahm, A. Weissfeld. (2007) "Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology". 12edn. Mosby.
- Freyer, F., A. Vabret, et al. (2006). "Comparison of multiplex PCR assays and conventional techniques for the diagnostic of respiratory virus infections in children admitted to hospital with an acute respiratory illness." *J Med Virol* **78**(11): 1498-1504.
- Frøbert, E., V. Escuret, et al. (2011). "Respiratory viruses in children admitted to hospital intensive care units: evaluating the CLART(R) Pneumovir DNA array." *J Med Virol* **83**(1): 150-155.
- Fujitsuka, A., H. Tsukagoshi, et al. (2011). "A molecular epidemiological study of respiratory viruses detected in Japanese children with acute wheezing illness." *BMC Infect Dis* **11**: 168.
- Fujitsuka, A., H. Tsukagoshi, et al. (2011). "A molecular epidemiological study of respiratory viruses detected in Japanese children with acute wheezing illness." *BMC Infect Dis* **11**: 168.
- Garcia, L.M. (2007). "Virus Respiratórios emergentes." *Revista de Patologia Respiratoria* **10**(1)
- Greer, R. M., P. McErlean, et al. (2009). "Do rhinoviruses reduce the probability of viral co-detection during acute respiratory tract infections?" *J Clin Virol* **45**(1): 10-15.
- Halfhide, C. and R. L. Smyth (2008). "Innate immune response and bronchiolitis and preschool recurrent wheeze." *Paediatr Respir Rev* **9**(4): 251-262.
- Hindiyeh, M. Y., N. Keller, et al. (2008). "High rate of human bocavirus and adenovirus coinfection in hospitalized Israeli children." *J Clin Microbiol* **46**(1): 334-337.
- Houng, H. S., H. Gong, et al. (2010). "Genome sequences of human adenovirus 14 isolates from mild respiratory cases and a fatal pneumonia, isolated during 2006-2007 epidemics in North America." *Respir Res* **11**: 116.
- Huang, Y., H. Tang, et al. (2009). "Multiplex assay for simultaneously typing and subtyping influenza viruses by use of an electronic microarray." *J Clin Microbiol* **47**(2): 390-396.
- Jartti, L., H. Langen, et al. (2011). "New respiratory viruses and the elderly." *Open Respir Med J* **5**: 61-69.
- Jartti, T., B. van den Hoogen, et al. (2002). "Metapneumovirus and acute wheezing in children." *Lancet* **360**(9343): 1393-1394.
- Kahn, J. S. (2006). "Epidemiology of human metapneumovirus." *Clin Microbiol Rev* **19**(3): 546-557.
- Kesson, A. M. (2007). "Respiratory virus infections." *Paediatr Respir Rev* **8**(3): 240-248.
- Kim, S., H. Sung, et al. (2009). "Molecular epidemiological investigation of a nosocomial outbreak of human metapneumovirus infection in a pediatric hemato-oncology patient population." *J Clin Microbiol* **47**(4): 1221-1224.
- Kim, S. R., C. S. Ki, et al. (2009). "Rapid detection and identification of 12 respiratory viruses using a dual priming oligonucleotide system-based multiplex PCR assay." *J Virol Methods* **156**(1-2): 111-116.
- Kim, Y. J., M. Boeckh, et al. (2007). "Community respiratory virus infections in immunocompromised patients: hematopoietic stem cell and solid organ transplant

recipients, and individuals with human immunodeficiency virus infection." Semin Respir Crit Care Med **28**(2): 222-242.

- Knipe, M. D., Howley, M. P., et al. (2007). "Fields Virology". Vol. 2, 5edn. Lippincott William & Wilkins.
- Korteweg, C. and J. Gu (2010). "Pandemic influenza A (H1N1) virus infection and avian influenza A (H5N1) virus infection: a comparative analysis." Biochem Cell Biol **88**(4): 575-587.
- Kunz, A. N. and M. Ottolini (2010). "The role of adenovirus in respiratory tract infections." Curr Infect Dis Rep **12**(2): 81-87.
- Kuypers, J., A. P. Campbell, et al. (2009). "Comparison of conventional and molecular detection of respiratory viruses in hematopoietic cell transplant recipients." Transpl Infect Dis **11**(4): 298-303.
- Lam, W. Y., A. C. Yeung, et al. (2007). "Rapid multiplex nested PCR for detection of respiratory viruses." J Clin Microbiol **45**(11): 3631-3640.
- Langley, J. M. and M. E. Faughnan (2004). "Prevention of influenza in the general population." CMAJ **171**(10): 1213-1222.
- Lapante, J. M., S. A. Marshall, et al. (2009). "Influenza antiviral resistance testing in New York and Wisconsin, 2006 to 2008: methodology and surveillance data." J Clin Microbiol **47**(5): 1372-1378.
- Lau, S. K., K. S. Li, et al. (2009). "Clinical and molecular epidemiology of human parainfluenza virus 4 infections in Hong Kong: subtype 4B as common as subtype 4A." J Clin Microbiol **47**(5): 1549-1552.
- Lee, J. A., N. H. Kim, et al. (2005). "Rapid identification of human adenovirus types 3 and 7 from respiratory specimens via multiplex type-specific PCR." J Clin Microbiol **43**(11): 5509-5514.
- Lee, J. H., J. K. Chun, et al. (2010). "Identification of adenovirus, influenza virus, parainfluenza virus, and respiratory syncytial virus by two kinds of multiplex polymerase chain reaction (PCR) and a shell vial culture in pediatric patients with viral pneumonia." Yonsei Med J **51**(5): 761-767.
- Lehtinen, P., A. Ruohola, et al. (2007). "Prednisolone reduces recurrent wheezing after a first wheezing episode associated with rhinovirus infection or eczema." J Allergy Clin Immunol **119**(3): 570-575.
- Letant, S. E., J. I. Ortiz, et al. (2007). "Multiplexed reverse transcriptase PCR assay for identification of viral respiratory pathogens at the point of care." J Clin Microbiol **45**(11): 3498-3505.
- Li, H., M. A. McCormac, et al. (2007). "Simultaneous detection and high-throughput identification of a panel of RNA viruses causing respiratory tract infections." J Clin Microbiol **45**(7): 2105-2109.
- Loeffelholz, M. and T. Chonmaitree (2010). "Advances in diagnosis of respiratory virus infections." Int J Microbiol **2010**: 126049.
- Luiz, L. N., J. P. Leite, et al. (2010). "Molecular characterization of adenoviruses from children presenting with acute respiratory disease in Uberlandia, Minas Gerais, Brazil, and detection of an isolate genetically related to feline adenovirus." Mem Inst Oswaldo Cruz **105**(5): 712-716.
- Lupatkin, H. (2005). "Influenza Vaccine in the Elderly and Chronic Obstructive Pulmonary Disease." Curr Infect Dis Rep **7**(3): 200-203.
- MacInnes, H., Y. Zhou, et al. (2011). "Transmission of aerosolized seasonal H1N1 influenza A to ferrets." PLoS One **6**(9): e24448.
- McDevitt J, Rudnick S, et al. (2010). "Role of absolute humidity in the inactivation of influenza viruses on stainless steel surfaces at elevated temperatures." Appl Environ Microbiol.: **76**(12): 3943-7.

- Maffey, A. F. (2008). "[New viruses associated with respiratory infections in children]." Arch Argent Pediatr **106**(4): 341-350.
- Mahony, J. B. (2008). "Detection of respiratory viruses by molecular methods." Clin Microbiol Rev **21**(4): 716-747.
- Mandelboim, M., P. Dror, et al. (2011). "Adenovirus infections in hospitalized patients in Israel: epidemiology and molecular characterization." J Clin Microbiol **49**(2): 597-601.
- Martin, E. T., J. Taylor, et al. (2009). "Detection of bocavirus in saliva of children with and without respiratory illness." J Clin Microbiol **47**(12): 4131-4132.
- Matsuzaki, Y., E. Takashita, et al. (2009). "Evaluation of a new rapid antigen test using immunochromatography for detection of human metapneumovirus in comparison with real-time PCR assay." J Clin Microbiol **47**(9): 2981-2984.
- McErlean, P., L. A. Shackelton, et al. (2007). "Characterisation of a newly identified human rhinovirus, HRV-QPM, discovered in infants with bronchiolitis." J Clin Virol **39**(2): 67-75.
- McNamara, P. S., B. F. Flanagan, et al. (2007). "Impact of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus co-infection in severe bronchiolitis." Pediatr Pulmonol **42**(8): 740-743.
- Metzgar, D., G. Skochko, et al. (2009). "Evaluation and validation of a real-time PCR assay for detection and quantitation of human adenovirus 14 from clinical samples." PLoS One **4**(9): e7081.
- Midulla, F., C. Scagnolari, et al. (2010). "Respiratory syncytial virus, human bocavirus and rhinovirus bronchiolitis in infants." Arch Dis Child **95**(1): 35-41.
- Miller, E. K., K. M. Edwards, et al. (2009). "A novel group of rhinoviruses is associated with asthma hospitalizations." J Allergy Clin Immunol **123**(1): 98-104 e101.
- Miller, E. K., N. Khuri-Bulos, et al. (2009). "Human rhinovirus C associated with wheezing in hospitalised children in the Middle East." J Clin Virol **46**(1): 85-89.
- Monto, A. S. and R. J. Whitley (2008). "Seasonal and pandemic influenza: a 2007 update on challenges and solutions." Clin Infect Dis **46**(7): 1024-1031.
- Munday, D. C., E. Emmott, et al. (2010). "Quantitative proteomic analysis of A549 cells infected with human respiratory syncytial virus." Mol Cell Proteomics **9**(11): 2438-2459.
- Munday, D. C., J. A. Hiscox, et al. (2010). "Quantitative proteomic analysis of A549 cells infected with human respiratory syncytial virus subgroup B using SILAC coupled to LC-MS/MS." Proteomics **10**(23): 4320-4334.
- Murray, R.P., Baron J. et al. (2007) "Manual of Clinical Microbiology." Vol.2, 9edn. Washington D.C. Nichols, W. G., A. J. Peck Campbell, et al. (2008). "Respiratory viruses other than influenza virus: impact and therapeutic advances." Clin Microbiol Rev **21**(2): 274-290, table of contents.
- Nokes, D. J., E. A. Okiro, et al. (2008). "Respiratory syncytial virus infection and disease in infants and young children observed from birth in Kilifi District, Kenya." Clin Infect Dis **46**(1): 50-57.
- Ogra, P. L. (2004). "Respiratory syncytial virus: the virus, the disease and the immune response." Paediatr Respir Rev **5 Suppl A**: S119-126.
- Olofsson, S., R. Brittain-Long, et al. (2011). "PCR for detection of respiratory viruses: seasonal variations of virus infections." Expert Rev Anti Infect Ther **9**(8): 615-626.
- Pabbaraju, K., S. Wong, et al. (2009). "Design and validation of real-time reverse transcription-PCR assays for detection of pandemic (H1N1) 2009 virus." J Clin Microbiol **47**(11): 3454-3460.
- Pachucki, C. T. (2005). "Rapid Tests for Influenza." Curr Infect Dis Rep **7**(3): 187-192.
- Pajak, B., I. Stefanska, et al. (2011). "Rapid differentiation of mixed influenza A/H1N1 virus infections with seasonal and pandemic variants by multitemperature single-stranded conformational polymorphism analysis." J Clin Microbiol **49**(6): 2216-2221.

- Paranhos-Baccala, G., F. Komurian-Pradel, et al. (2008). "Mixed respiratory virus infections." J Clin Virol **43**(4): 407-410.
- Paula, N. T., B. M. Carneiro, et al. (2011). "Human rhinovirus in the lower respiratory tract infections of young children and the possible involvement of a secondary respiratory viral agent." Mem Inst Oswaldo Cruz **106**(3): 316-321.
- Pinto Mendes, J. (2008). "The role of infection in asthma." Rev Port Pneumol **14**(5): 647-675.
- Piralla, A., F. Baldanti, et al. (2011). "Phylogenetic patterns of human respiratory picornavirus species, including the newly identified group C rhinoviruses, during a 1-year surveillance of a hospitalized patient population in Italy." J Clin Microbiol **49**(1): 373-376.
- Piralla, A., F. Rovida, et al. (2009). "Clinical severity and molecular typing of human rhinovirus C strains during a fall outbreak affecting hospitalized patients." J Clin Virol **45**(4): 311-317.
- Renois, F., D. Talmud, et al. (2010). "Rapid detection of respiratory tract viral infections and coinfections in patients with influenza-like illnesses by use of reverse transcription-PCR DNA microarray systems." J Clin Microbiol **48**(11): 3836-3842.
- Robinson, C. M., G. Singh, et al. (2011). "Computational analysis and identification of an emergent human adenovirus pathogen implicated in a respiratory fatality." Virology **409**(2): 141-147.
- Roh, K. H., J. Kim, et al. (2008). "Comparison of the Seeplex reverse transcription PCR assay with the R-mix viral culture and immunofluorescence techniques for detection of eight respiratory viruses." Ann Clin Lab Sci **38**(1): 41-46.
- Russell, W. C. (2000). "Update on adenovirus and its vectors." J Gen Virol **81**(Pt 11): 2573-2604.
- Sadeghi, C. D., C. Aebi, et al. (2011). "Twelve years' detection of respiratory viruses by immunofluorescence in hospitalised children: impact of the introduction of a new respiratory picornavirus assay." BMC Infect Dis **11**: 41.
- Schildgen, O., A. Muller, et al. (2008). "Human bocavirus: passenger or pathogen in acute respiratory tract infections?" Clin Microbiol Rev **21**(2): 291-304, table of contents.
- Selvarangan, R., D. Abel, et al. (2008). "Comparison of BD Directigen EZ RSV and Binax NOW RSV tests for rapid detection of respiratory syncytial virus from nasopharyngeal aspirates in a pediatric population." Diagn Microbiol Infect Dis **62**(2): 157-161.
- Semple, M. G., A. Cowell, et al. (2005). "Dual infection of infants by human metapneumovirus and human respiratory syncytial virus is strongly associated with severe bronchiolitis." J Infect Dis **191**(3): 382-386.
- Sigalov, A. B. (2010). "The SCHOOL of nature: IV. Learning from viruses." Self Nonself **1**(4): 282-298.
- Sloots, T. P., D. M. Whiley, et al. (2008). "Emerging respiratory agents: new viruses for old diseases?" J Clin Virol **42**(3): 233-243.
- Smyth, R. L. and P. J. Openshaw (2006). "Bronchiolitis." Lancet **368**(9532): 312-322.
- Sorce, L. R. (2009). "Respiratory syncytial virus: from primary care to critical care." J Pediatr Health Care **23**(2): 101-108.
- Steer, P. A., N. C. Kirkpatrick, et al. (2009). "Classification of fowl adenovirus serotypes by use of high-resolution melting-curve analysis of the hexon gene region." J Clin Microbiol **47**(2): 311-321.
- Stehle, J., N. Voirin, et al. (2011). "High-resolution measurements of face-to-face contact patterns in a primary school." PLoS One **6**(8): e23176.
- Stroparo, E., C. R. Cruz, et al. (2010). "Adenovirus respiratory infection: significant increase in diagnosis using PCR comparing with antigen detection and culture methods." Rev Inst Med Trop Sao Paulo **52**(6): 317-321.
- Suzuki, Y., R. Saito, et al. (2010). "Rapid and specific detection of amantadine-resistant influenza A viruses with a Ser31Asn mutation by the cycling probe method." J Clin Microbiol **48**(1): 57-63.

- Syrmis, M. W., D. M. Whiley, et al. (2004). "A sensitive, specific, and cost-effective multiplex reverse transcriptase-PCR assay for the detection of seven common respiratory viruses in respiratory samples." *J Mol Diagn* **6**(2): 125-131.
- Tamura, D., K. Mitamura, et al. (2009). "Oseltamivir-resistant influenza A viruses circulating in Japan." *J Clin Microbiol* **47**(5): 1424-1427.
- Tan, J, and M.P. Carlos (2010). "Laboratory surveillance of co-circulating respiratory viruses and enteroviruses during the 2009 H1N1 influenza pandemic." *Microbiology and Microbial Biotechnology*: 779-788.
- Tang, L., L. Wang, et al. (2011). "Adenovirus serotype 7 associated with a severe lower respiratory tract disease outbreak in infants in Shaanxi Province, China." *Viol J* **8**: 23.
- Tapparel, C., T. Junier, et al. (2009). "New respiratory enterovirus and recombinant rhinoviruses among circulating picornaviruses." *Emerg Infect Dis* **15**(5): 719-726.
- Tellier, R. (2009). "Aerosol transmission of influenza A virus: a review of new studies." *J R Soc Interface* **6 Suppl 6**: S783-790.
- Trebbien, R., L. E. Larsen, et al. (2011). "Distribution of sialic acid receptors and influenza A virus of avian and swine origin in experimentally infected pigs." *Viol J* **8**: 434.
- Tregoning, J. S. and J. Schwarze (2010). "Respiratory viral infections in infants: causes, clinical symptoms, virology, and immunology." *Clin Microbiol Rev* **23**(1): 74-98.
- Tyrrell, D. A. J. and S. H. Myint (1996). "Coronaviruses."
- van Woensel, J. B., A. P. Bos, et al. (2006). "Absence of human metapneumovirus co-infection in cases of severe respiratory syncytial virus infection." *Pediatr Pulmonol* **41**(9): 872-874.
- Waner, J. L., N. J. Whitehurst, et al. (1990). "Comparison of directigen RSV with viral isolation and direct immunofluorescence for the identification of respiratory syncytial virus." *J Clin Microbiol* **28**(3): 480-483.
- Wang, K., W. Wang, et al. (2010). "Correlation between bocavirus infection and humoral response, and co-infection with other respiratory viruses in children with acute respiratory infection." *J Clin Virol* **47**(2): 148-155.
- Wang, K. C., J. S. Chang, et al. (2009). "4-Methoxycinnamaldehyde inhibited human respiratory syncytial virus in a human larynx carcinoma cell line." *Phytomedicine* **16**(9): 882-886.
- Wang, W. K., C. T. Fang, et al. (2005). "Detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus RNA in plasma during the course of infection." *J Clin Microbiol* **43**(2): 962-965.
- Warren, L. (2009). "The aetiology of childhood asthma." *Paediatrics and Child Health* **19**:6.
- Warris, A. and R. de Groot (2006). "Human metapneumovirus: an important cause of acute respiratory illness." *Adv Exp Med Biol* **582**: 251-264.
- Welnowska, E., M. A. Sanz, et al. (2011). "Translation of viral mRNA without active eIF2: the case of picornaviruses." *PLoS One* **6**(7): e22230.
- Wisdom, A., E. C. Leitch, et al. (2009). "Screening respiratory samples for detection of human rhinoviruses (HRVs) and enteroviruses: comprehensive VP4-VP2 typing reveals high incidence and genetic diversity of HRV species C." *J Clin Microbiol* **47**(12): 3958-3967.
- Wohlford-Lenane, C. L., D. K. Meyerholz, et al. (2009). "Rhesus theta-defensin prevents death in a mouse model of severe acute respiratory syndrome coronavirus pulmonary disease." *J Virol* **83**(21): 11385-11390.
- Yasuda, H., T. Suzuki, et al. (2005). "Inflammatory and bronchospastic factors in asthma exacerbations caused by upper respiratory tract infections." *Tohoku J Exp Med* **207**(2): 109-118.
- Yilmaz, G., N. Isik, et al. (1999). "Detection of respiratory syncytial virus in samples frozen at -20 degrees C." *J Clin Microbiol* **37**(7): 2390.
- Yozwiak, N. L., P. Skewes-Cox, et al. (2010). "Human enterovirus 109: a novel interspecies recombinant enterovirus isolated from a case of acute pediatric respiratory illness in Nicaragua." *J Virol* **84**(18): 9047-9058.